

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la osteointegración en un modelo animal osteoporótico:
Efectos de la aplicación local de IGF-I**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mónica Montiel Bautista

Directores

Juan López-Quiles Martínez
Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil
Celia Clemente de Arriba

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**Departamento de Estomatología III (Medicina y
Cirugía Bucofacial)**



**ESTUDIO DE LA OSTEointegración
EN UN MODELO ANIMAL
OSTEOPORÓTICO: EFECTOS DE LA
APLICACIÓN LOCAL DE IGF-I**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mónica Montiel Bautista

Directores

Dr. D. Juan López-Quiles Martínez

Dra. Dña. Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil

Dra. Dña. Celia Clemente de Arriba

Madrid, 2015



ESTUDIO DE LA OSTEOINTEGRACIÓN EN UN MODELO ANIMAL OSTEOPORÓTICO: EFECTOS DE LA APLICACIÓN LOCAL DE IGF-I

TESIS DOCTORAL

Mónica Montiel Bautista

Directores

Dr. D. Juan López-Quiles Martínez

Dra. Dña. Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil

Dra. Dña. Celia Clemente de Arriba

Madrid, 2015

A mi familia

Agradecimientos

Quiero dar las gracias, en primer lugar, a mis directores,

Al Dr. Juan López-Quiles Martínez porque además de su saber hacer me ha proporcionado su apoyo constante e incondicional, por su optimismo, por estar siempre ahí.

A la Dra. Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil por transmitirme sus conocimientos con toda generosidad, por su alegría, por sus acertadas correcciones. Sin tu ayuda no estaría aquí.

A la Dra. Celia Clemente de Arriba por haberme guiado y acompañado en las muchas horas de laboratorio, por compartir conmigo sus conocimientos histológicos, por su apoyo, ayuda y sus sabios consejos.

Al Prof. Dr. Jesús A. Fernández-Tresguerres Hernández por facilitarnos el IGF-I.

Al Dr. Luis Blanco Jerez, por su inestimable colaboración en la fase quirúrgica de este proyecto.

También quiero dar las gracias, de una manera muy especial, a M^a Teresa García de Juan y a Cristina Reyes Martín, por hacerme el trabajo más fácil, por no separarse de mí durante toda la fase de laboratorio, por aportar sus conocimientos a este trabajo y por el tiempo que me han dedicado siempre con una sonrisa. A la Profa. Dra. Rosa Rodríguez Torres por brindarme su ayuda cuando la he necesitado.

A Don Pedro Cuesta, estadístico de la Oficina de Apoyo a la Investigación de la UCM, por realizar la estadística de este trabajo. Muchas, muchas gracias.

A la Dra. Elena Martín Monge, tú también formas parte de todo esto.

A Bori, Moni y Javi por su paciencia.

Y finalmente quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma, han hecho posible que este proyecto llegue a su fin.

ÍNDICE

Resumen en español.....	IV
Resumen en inglés.....	VIII
Índice de tablas	XII
Índice de figuras.....	XIII
Índice de acrónimos.....	XV
 1. Introducción.....	 1
1.1 Tejido óseo.....	2
1.1.1 Anatomía.....	3
1.1.2 Estructura.....	4
1.1.2.1 Fase inorgánica.....	4
1.1.2.2 Fase orgánica.....	4
1.1.2.3 Células óseas.....	6
1.1.3 Remodelado óseo.....	11
1.1.4 Regeneración y reparación ósea.....	14
1.1.5 Mecanismos relacionados con la regeneración ósea.....	15
1.1.5.1 Osteogénesis.....	15
1.1.5.2 Osteoconducción.....	15
1.1.5.3 Osteoinducción.....	15
1.1.5.4 Osteointegración.....	16
1.2 Factores de crecimiento.....	19
1.2.1 Mecanismo de acción.....	26
1.2.2 IGF-I	28
1.2.2.1 Regulación de la secreción.....	30
1.2.2.2 Mecanismo de acción.....	32
1.2.2.3 Efectos del IGF-I.....	34
1.2.2.4 Uso como agente terapéutico.....	37
1.3 Osteoporosis	39
1.3.1 Concepto y diagnóstico.....	40
1.3.2 Clasificación.....	54
1.3.3 Fisiopatología.....	55
1.3.4 Epidemiología.....	59

1.3.5 Tratamiento.....	60
1.4 Modelo experimental.....	70
2. Justificación.....	80
3. Hipótesis de trabajo.....	86
4. Objetivos	88
5. Material y método.....	90
5.1 Material	
5.1.1 Animales de experimentación.....	91
5.1.2 Farmacología.....	93
5.1.3 Absorciómetro.....	94
5.1.4 Material quirúrgico.....	97
5.1.4.1 Material para ovariectomía.....	98
5.1.4.2 Material para fase implantológica.....	98
5.1.5 Material para el estudio histológico.....	98
5.1.6 Material para el estudio morfométrico.....	99
5.1.7 Material fotográfico.....	99
5.2 Método	
5.2.1 Modelo de osteoporosis experimental.....	100
5.2.1.1 Ovariectomía.....	105
5.2.1.2 Dieta.....	106
5.2.2 Estudio de la osteointegración.....	107
5.2.2.1 Fase implantológica.....	107
5.2.2.2 Preparación de las muestras.....	111
5.2.2.3 Estudio histomorfométrico.....	115
5.2.3 Análisis estadístico.....	119
5.2.3.1 Datos de la densitometría.....	119
5.2.3.2 Datos morfométricos.....	120
6. Resultados	121
6.1 Pesos.....	121
6.2 Densitometrías in vivo.....	122
6.3 Fase implantológica.....	123
6.3.1 Análisis histológico.....	123

6.3.2 Análisis morfométrico.....	136
7. Discusión.....	146
7.1 Modelo de experimentación animal.....	147
7.2 Determinación de la densidad mineral ósea.....	152
7.3 Características de los implantes.....	155
7.4 ¿Influye la osteoporosis en la osteointegración de los implantes?.....	156
7.4.1 Resultados histológicos.....	158
7.4.2 Resultados morfométricos.....	158
7.5 ¿Influye la aplicación de 4 µg de IGF-I en el lecho quirúrgico en la integración de los implantes?.....	159
7.6 Mecanismo mediante el cual actúa IGF-I de forma local....	165
8. Conclusiones.....	168
9. Bibliografía.....	170
10. Anexo.....	179
10.1 Documento de aprobación del Comité Ético.....	180

RESUMEN

ESTUDIO DE OSTEointegración EN UN MODELO ANIMAL OSTEOPORÓTICO: EFECTOS DE LA APLICACIÓN LOCAL DE IGF-I.

Debido al aumento de la esperanza de vida, cada vez con mayor frecuencia, se encuentran pacientes de edad avanzada y hay que enfrentarse a la necesidad de reponer dientes perdidos, para así, restablecer tanto la función como la estética de estos pacientes, permitiéndoles mantener una calidad de vida adecuada. Para ello, se emplean diversas técnicas y entre ellas destacan los implantes dentales osteointegrados.

Este aumento de pacientes de edad avanzada implica la presencia de situaciones más críticas en cuanto a cantidad y calidad de hueso presente para la colocación de los implantes. Una de las patologías frecuentes en esta población, especialmente en el sexo femenino, es la osteoporosis.

Para comprender los mecanismos que afectan a la osteointegración de los implantes, es necesario conocer las características del tejido óseo, su anatomía, su estructura y su metabolismo, en el que intervienen, entre otros, los factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento son polipéptidos, mediadores metabólicos, promotores del crecimiento y secretados por distintos tejidos, que actúan, a bajas concentraciones, sobre células diana modulando sus funciones, especialmente crecimiento, diferenciación y proliferación celular. En este trabajo se utiliza el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I). El papel eminentemente anabólico del IGF-I y los numerosos estudios que sugieren la capacidad

regenerativa de determinados factores de crecimiento, incluido el IGF-I, es lo que nos ha llevado a estudiar su posible efecto favorecedor de la osteointegración.

La investigación se desarrolla en un modelo de experimentación animal (conejas de la raza Nueva Zelanda), con osteoporosis inducida mediante ovariectomía y 6 semanas de dieta hipocálcica (0,07% de calcio). La osteoporosis se confirma mediante DEXA, con valores de DMO pre y post ovariectomía y dieta.

Con este modelo se trata de reproducir condiciones similares a las que se presentan en los pacientes comprometidos en cuanto a su capacidad de regeneración ósea tras la colocación de implantes, y poder así valorar los efectos, en la osteointegración, de la aplicación local de 4µg de IGF-I.

La hipótesis de trabajo que planteamos es que la aplicación tópica de 4 microgramos (µg) del factor de crecimiento IGF-I, en el lecho quirúrgico, previa a la colocación de un implante osteointegrado en la tibia de un animal de experimentación con osteoporosis inducida mediante ovariectomía y dieta hipocálcica, mejora la osteointegración del mismo. Partiendo de esta hipótesis nos planteamos nuestros objetivos y el principal es valorar si la administración local de IGF-I puede inducir diferencias cualitativas y/o cuantitativas en la osteointegración de implantes dentales en animales sanos y en animales osteoporóticos.

Se realiza un estudio histológico para el análisis cualitativo y un estudio morfométrico para las valoraciones cuantitativas utilizando para ello el valor de BIC (*bone to implant contact*).

Contamos con 16 animales que se distribuyen en cuatro grupos de trabajo (CONTROL/SANOS, CONTROL/OVX, IGF-I/SANOS, IGF-I/OVX). Se han colocado dos implantes en cada animal, uno en tibia derecha y otro en tibia izquierda. A seis de los animales, (tres SANOS y tres OVX), se les colocaron los implantes sin tratamiento adicional (grupo control) y a otros diez animales (cinco SANOS y cinco OVX) se les colocaron los implantes introduciendo, previamente en el lecho quirúrgico, 4µg de IGF-I (Gropep Limited®). Tras 15 días se diseccionaron las tibias y se incluyeron en metacrilato y tras el procesamiento de la muestra se procedió a su análisis histológico con microscopía óptica y a análisis morfométrico con el software MIP-45 Advance, sistema avanzado integral de análisis de imagen para cuantificar el BIC.

Tras el análisis estadístico de los datos, los referidos al modelo animal de experimentación, confirman una disminución de la DMO en las tres zonas exploradas (calota, tibia y columna cervical), siendo estadísticamente significativos los datos de calota y columna cervical ($p < 0,05$).

Para valorar la osteointegración, se ha realizado un estudio histológico mediante lupa y microscopio óptico, en los diferentes grupos. Los resultados muestran menor actividad neoformadora, mayor presencia de tejido osteoide, no calcificado y escasas presencia de trabéculas neoformadas, muy delgadas en los animales osteoporóticos. La aplicación de IGF-I no induce cambios en la histología.

En cuanto a los valores de BIC, los resultados muestran que el efecto del factor ovariectomía es significativo sobre el BIC para un $p < 0,10$, con $p = 0,094$. Sin embargo, la aplicación local de IGF-I y la interacción entre ambos factores, no muestran diferencias significativas sobre el BIC con un $p > 0,10$.

El valor del BIC disminuye con la aplicación de IGF-I en los animales sanos de forma significativa para un $p < 0,10$ ($p = 0,07$). En los animales ovariectomizados la aplicación de factor de crecimiento no modifica la osteointegración.

Tras la realización de este trabajo, se llega a las siguientes conclusiones:

1. Mediante la ovariectomía bilateral y dieta hipocálcica con el 0,07% de calcio se consigue una disminución estadísticamente significativa de la DMO en calota y columna, mientras que en la tibia disminuye sin ser significativa, medida mediante densitometrías *in vivo*.

2. En el estudio histológico, se observa una menor cantidad de hueso, tanto cortical como trabecular en los animales con osteoporosis inducida, así como una mayor cantidad de tejido osteoide.

3. La administración local de 4 μg de IGF-I no induce cambios en la histología.

4. El BIC disminuye de forma estadísticamente significativa en los animales con osteoporosis experimental.

5. La administración local de 4 μg de IGF-I en el lecho quirúrgico inmediatamente antes de la colocación del implante, no mejora el BIC en el animal con osteoporosis inducida.

6. Sorprendentemente, la administración local de 4 μg de IGF-I disminuye, de forma estadísticamente significativa, la osteointegración en animales sanos, sin osteoporosis.

7. Dentro de las limitaciones de este estudio experimental, la administración local de 4 μg de IGF-I no sirve para favorecer la osteointegración en animales con osteoporosis inducida y resulta contraproducente en animales sanos.

ABSTRACT

OSSEOINTEGRATION IN AN OSTEOPOROTIC ANIMAL MODEL: EFFECTS OF LOCAL APPLICATION OF IGF-I.

In this era of increasing life expectancy, growing numbers of elderly patients face the need to replace lost teeth. This requires a technique that will restore both dental function and esthetics and allow these patients to maintain an adequate quality of life. Among the various rehabilitation techniques available, osseointegrated dental implants are becoming an ever more popular treatment option.

As growing numbers of elderly patients seek rehabilitation by dental implants, dentists must deal with cases in which the quality and quantity of bone is compromised. Within this scenario, osteoporosis is one of the more common pathologies affecting this patient group, especially women.

To reach a clear understanding of the mechanisms underlying implant osseointegration in each individual case, it is essential to be in full awareness of bone tissue characteristics, anatomy, structure and bone metabolism. Various factors play their part in determining these characteristics and among these, growth factors is one of the most important.

Growth factors comprise polypeptides, metabolic mediators, growth promoters, and secretions from various tissues, which act at low concentrations on target cells modulating their various functions, particularly cell growth, differentiation, and proliferation. The present study looks at insulin-like growth factor-I (IGF-I).

It is clear that IGF-I plays a preeminent anabolic role and prolific research into

growth factors – among them IGF-I – points to their regenerative capacity. For this reason, the present study set out to investigate the possible positive effects of IGF-I on osseointegration.

The study was performed using an experimental animal model (New Zealand rabbits) with osteoporosis induced by performing ovariectomies and subjecting the animals to a low-calcium (0.07% calcium) diet for six weeks. The presence of osteoporosis was confirmed by means of dual energy x-ray absorptiometry (DEXA), registering bone mineral density (BMD) values pre- and post-ovariectomy/diet.

This choice of animal model aimed to reproduce similar conditions to those in patients compromised in terms of bone regeneration capacity in order to evaluate the effects of local applications of IGF-I on dental implant osseointegration in an osteoporotic population.

The study hypothesis was that the topical application of 4 micrograms (μg) of IGF-I growth factor to the surgical bed before the placement of a dental implant in the tibia of an animal with osteoporosis induced by ovariectomy and a low-calcium diet would improve implant osseointegration. On the basis of this hypothesis, the main study objective was to determine whether or not the topical administration of IGF-I might induce quantitative and qualitative differences in the osseointegration of dental implants between healthy and osteoporotic animals.

Qualitative analysis was performed by means of histological study. Morphometric study was carried out to obtain quantitative evaluations of bone-to-implant contact (BIC).

The study sample comprised 16 New Zealand rabbits divided into four study groups: CONTROL/HEALTHY; CONTROL/OVARECTOMIZED; IGF-I/HEALTHY; IGF-I/OVARECTOMIZED. Two implants were placed in each animal, one in the right tibia and one in the left. Six of the animals (three HEALTHY and three OVARECTOMIZED) had implants inserted unaccompanied by any additional substances, and the other ten animals (five HEALTHY and five OVARECTOMIZED) had implants placed with the addition of 4µg IGF-I (Gropep Limited®) to the surgical bed just before implant insertion. After 15 days healing and osseointegration, the tibiae were dissected, set in methacrylate resin, which, after processing, underwent histological analysis under an optical microscope and morphometric analysis using MIP-45 advanced system image analysis software.

Statistical analysis of the DEXA data obtained confirmed a reduction in BMD in the sample of ovariectomized animals in the three areas analyzed (cranial calvaria, tibia, and spinal column), with statistically significant differences for cranial calvaria and spinal column data ($p < 0.05$).

To evaluate osseointegration, an histological study of the different groups was performed using a magnifying glass and an optical microscope. In osteoporotic animals, the results revealed less bone neoformation activity, greater presence of osteoid tissue, non-calcification and little presence of neoformed trabeculae, which were observed to be very thin. Analysis of the results showed that the topical application of IGF-I did not appear to induce any histological changes.

Regarding BIC values, the results showed that the ovariectomy factor had a statistically significant effect on BIC for $p < 0.10$, obtaining a p value of 0.094. However,

the topical application of IGF-I and the interaction of these two factors did not produce statistically significant differences in BIC for $p < 0.10$.

BIC values decreased with the topical application of IGF-I in healthy animals with statistical significance for $p < 0.10$ ($p = 0.07$). In ovariectomized animals, the application of this growth factor did not modify osseointegration.

On the basis of the data obtained in this study, it may be concluded that:

1. By bilateral ovariectomy and a low-calcium diet (0.07% calcium) statistically significant decrease in DMO is achieved in calvaria and cervical spine, while the tibia decreases without being statistically significant, in vivo measured by densitometry.

2. The histological analysis shows less both cortical and trabecular bone in animals with induced osteoporosis, as well as an increased amount of osteoid.

3. Topical application of 4 μ g IGF-I induces no histological changes.

4. The value of BIC significantly decreases in animals with experimental osteoporosis.

5. Topical application of 4 μ g IGF-I to the surgical bed, just before implant insertion, does not improve BIC in animals with induced osteoporosis.

6. Surprisingly, the topical application of 4 μ g IGF-I decreases osseointegration in healthy animals, without osteoporosis.

7. Within the constraints of this experimental study, the topical application of 4 μ g IGF-I is not useful to promote osseointegration in animals with induced osteoporosis and counterproductive in healthy animals.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Proteínas de la matriz osteoide.....	6
Tabla 2: Regulación del remodelado óseo por factores locales.....	13
Tabla 3: Técnicas densitométricas y lugares de exploración.....	47
Tabla 4: Características de las distintas técnicas de medición de masa ósea.....	48
Tabla 5: Clasificación de la OMS 2004.....	53
Tabla 6: Factores de riesgo para masa ósea baja.....	58
Tabla 7: Grupos de pacientes susceptibles de recibir tratamiento.....	69
Tabla 8: Distribución de grupos de estudio.....	109
Tabla 9: Densidad mineral ósea antes y después de ovariectomía y dieta hipocálcica.....	123
Tabla 10: Valores de BIC en % en los distintos grupos de estudio.....	137
Tabla 11: Prueba de efectos intersujetos.....	139
Tabla 12: Estadística de grupos: animales SANOS.....	141
Tabla 13: Pruebas de muestra independientes: animales sanos.....	141
Tabla 14: Estadística de grupos: animales OVX.....	142
Tabla 15: Pruebas de muestra independientes: animales OVX.....	142
Tabla 16: Estadística de grupos: animales con IGF-I.....	143
Tabla 17: Pruebas de muestra independientes: animales con IGF-I.....	143
Tabla 18: Estadística de grupos: animales sin IGF-I.....	144
Tabla 19: Pruebas de muestra independientes: animales sin IGF-I.....	144

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Estructura del factor de crecimiento similar a la insulina-I.....	28
Fig. 2: Secuencia de aminoácidos de IGF-I humana.....	29
Fig. 3: Animal de experimentación.....	91
Fig. 4: Fármacos.....	93
Fig. 5: Brazo del escáner.....	95
Fig. 6: Mesa y brazo del densitómetro.....	96
Fig. 6: Microscopio óptico.....	100
Fig. 7: Lupa con cámara fotográfica.....	100
Fig. 8: Posición del animal para la exploración.....	102
Fig. 9: Imágenes captadas por el software del densitómetro.....	104
Fig. 10: Localización del ovario.....	106
Fig. 11: Ovario.....	106
Fig. 12: Cirugía para la colocación de los implantes.....	110
Fig. 13: A) Imagen de los implantes colocados en las tibias. B) Detalle de la anterior.....	112
Fig. 14: Bloque de tibia que contiene el implante.....	112
Fig. 15: Preparación de los bloques de metacrilato. A y B) Fotopolimerización. C) Bloque polimerizado.....	113
Fig. 16: Obtención de las preparaciones. A)Detalle de la cortadora. B)Pulidora. C)Tinciones.....	114
Fig. 17: Tricrómico de Masson.....	116
Fig. 18: Hematoxilina-Eosina.....	116
Fig. 19: Azul de Toluidina.....	116
Fig. 20: Secuencia del método de análisis.....	117
Fig. 21: Grupo CONTROL/SANOS: Tinción Azul de Toluidina.....	124
Fig. 22 y 23: Grupo CONTROL/SANOS: Detalle de la neoformación ósea.....	125
Fig. 24: Grupo CONTROL/SANOS: Detalle de cortical.....	126
Fig. 25: Grupo CONTROL/OVX: Tinción Azul de Toluidina.....	127

Fig. 26: Grupo CONTROL/OVX: Tinción Tricrómico de Masson.....	128
Fig. 27: Grupo IGF-I/SANOS: Tinción Azul de Toluidina.....	129
Fig. 28: Grupo IGF-I/SANOS: Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	130
Fig. 29: Grupo IGF-I/SANOS: Tricrómico de Masson.....	131
Fig. 30: Grupo IGF-I/SANOS: Cortical normal.....	132
Fig. 31: Grupo IGF-I/OVX: Vista general de la osteointegración.....	133
Fig. 32: Grupo IGF-I/OVX: Detalle de trabéculas cortas y delgadas.....	134
Fig. 33: Grupo IGF-I/OVX: Detalle de escasa regeneración en cortical contraria..	135
Fig. 34: Comparativa de los cuatro grupos de estudio.....	136
Fig. 35: Gráfico representativo del BIC en los distintos grupos.....	138
Fig. 36: Representación gráfica de los resultados.....	140

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

1,25(OH) ₂ D3	1,25 – dihidroxivitamina D3 o calcitriol
ALS	Unidad ácido lábil
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Arg-Gly-Asp (RGD)	Tripéptido Arginina-glicina-aspártico
ATP	Adenosín trifostato
Bcl-2	Proto-oncogen del linfoma de células B (marcador de apoptosis)
BIC	Bone to impant contact o porcentaje de osteointegración
BMP _s	Proteínas morfogenéticas óseas
BMU	Unidades multicelulares básicas del remodelado óseo
CMO	Contenido mineral óseo
COX-2	Cicloxigenasa 2
CT	Calcitonina
CV	Coefficiente de variabilidad
Dkk-1	Proteína Dickkopf 1
DMO	Densidad mineral ósea
DMP1	Proteína de la matriz de dentina 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Absorciometría dual fotónica
DXA / DEXA	Absorciometría dual de RX
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FA	Fosfatasa alcalina
FAO	Fosfatasa alcalina ósea
FDA	Food and Drug Administration, Administración de fármacos y alimentos
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGF-23	Factor de crecimiento fibroblástico-23

GH	Hormona del crecimiento
GHR	Receptor de hormona de crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GLA	Ácido gamma-carboxiglutámico
GMA	2 hidroximetil metacrilato o glicol metacrilato
GM-CSF	Factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos
HA	Hidroxiapatita
ICTP	Telopéptido carboxi-terminal del colágeno
IGFBP	Proteínas de unión del IGF
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina, tipo I
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina, tipo II
IL	Interleuquina
INF-t	Interferón t
INTP	Telopéptido amino-terminal del colágeno
IOI	Implante osteointegrado.
JAK	Tipo de factor de transcripción
JNK	Janu-kinasa
kDa	Kilodalton
KeV	Kilo-electrón-voltio
M-CSF	Factor estimulante del crecimiento de colonias de macrófagos
MEPE	Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
OCN	Osteocalcina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ovariectomía, ovariectomizado/a
pDXA	Absorciometría periférica de rayos X doble
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PG _s	Prostaglandinas
PHEX	Endopeptidasa reguladora del fosfato
PICP	Propéptido carboxi-terminal del procolágeno I
PINP	Propéptido amino-terminal del procolágeno I
PKB	Proteína Kinasa B
pQCT	Tomografía computarizada cuantitativa periférica
PRP	Plasma rico en plaquetas.
PTH	Parathormona / hormona paratiroidea
QCT	Tomografía computarizada cuantitativa
QUS	Ultrasonido cuantitativo
RA	Absorciometría periférica de rayos X simple
RANK	Receptor activador del factor nuclear kappa B
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B
RX	Rayos X
SERMS	Moduladores selectivos de los receptores Estrogénicos
SOST	Gen que codifica la esclerostina
SPA	Absorciometría fotónica simple
SXA	Absorciometría por RX de energía simple
TC	Tomografía computarizada
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato-resistente
U.I.	Unidades internacionales
UAH	Universidad de Alcalá de Henares
UCM	Universidad Complutense de Madrid
US	Ultrasonidos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
Wnt	Familia de 19 glicoproteínas que favorecen la osteoblastogénesis (del inglés winless protein, proteína sin alas)

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TEJIDO ÓSEO

1.1 TEJIDO ÓSEO

El hueso es tejido conjuntivo mineralizado y especializado que conforma el esqueleto dando soporte al organismo y protección a los órganos vitales. Es un tejido vivo, muy vascularizado e innervado que está en continua remodelación.

1.1.1 Anatomía

Macroscópicamente se distinguen dos estructuras diferentes, el hueso compacto o cortical y el hueso esponjoso. El hueso compacto aparece como una masa sólida, continua, y forma habitualmente una lámina externa y otra interna en la periferia del hueso, mientras que el hueso esponjoso se localiza entre ambas láminas la parte interna y se presenta como una red de trabéculas óseas rodeadas por la médula ósea.⁽¹⁾

Microscópicamente ambos, cortical y esponjoso, presentan laminillas de matriz osteoide calcificada que se disponen de distinta forma, según sea hueso compacto o esponjoso. Mientras que en el esponjoso se disponen en forma de red, formando trabéculas, en el compacto o cortical se encuentran las laminillas dispuestas de manera concéntrica alrededor de los conductos de Havers. Estos conductos están relacionados entre sí por otros canales denominados canales de Volkmann; a través de ellos discurren los vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios. En esta sustancia mineralizada se encuentran unas lagunas donde se localizan los osteocitos, que extienden sus prolongaciones citoplasmáticas a través de una red de canalículos que se conectan entre sí y con los conductos de Havers. Todo este sistema, recibe el nombre de **osteona**.⁽²⁾

1.1.2 Estructura

El tejido óseo está compuesto por **células** especializadas y una **matriz extracelular** calcificada. En esta matriz se distinguen una fase orgánica, una fase mineral o inorgánica y agua.⁽²⁾

1.1.2.1 Fase inorgánica de la matriz extracelular

La porción inorgánica representa el 65%-70% del peso del hueso en seco, está constituido por un compuesto de fosfato cálcico formado por calcio, fosfato y carbonato en proporciones de 10:6:1, en forma de cristales de hidroxiapatita cuya fórmula es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y otros elementos como el flúor, magnesio, sodio, potasio, estroncio y manganeso en menor proporción.^(2,3)

El alto contenido mineral del hueso hace que sea el principal regulador de la cantidad de calcio, fosfato, magnesio y otros elementos del organismo. La vitamina D, la calcitonina y la parathormona (PTH) modulan la actividad de las células óseas para conseguir la homeostasis de todos estos elementos.

1.1.2.2 Fase orgánica de la matriz extracelular

La fase orgánica o sustancia osteoide supone un tercio del peso del hueso y está formada fundamentalmente por **proteínas colágenas** (90%). El colágeno tipo I es la más abundante (>95%) y juega un papel importante en la mineralización con ayuda de las proteínas no colágenas ya que el colágeno no tiene afinidad por el calcio⁽²⁾. Además, colágeno tipo V (<5%) que interviene en la disposición de las fibras colágenas en el hueso, y el tipo III que se asocia a las fibras de Sharpey y otras **proteínas no colágenas**.^(2,3)

En la molécula de colágeno se encuentra la secuencia Arg-Gly-Asp (tripéptido RGD) que interviene en el remodelado óseo.⁽²⁾

Entre las **proteínas no colágenas se distinguen:**

- **Proteoglicanos:** suponen alrededor del 10 % de las proteínas no colágenas. Se relacionan con la regulación de los factores de crecimiento, formación de fibrillas colágenas y en la mineralización ósea. El hialuronano y el condroitín sulfato actúan en fases iniciales de la formación ósea. Por su parte biglicano y decorina intervienen en etapas posteriores.
- **Proteínas que derivan del suero:** Albúmina y α_2 -SH glicoproteína. Se relacionan con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.
- **Proteínas con ácido γ -carboxiglutámico (GLA):** proteína GLA de la matriz y proteína GLA del hueso, llamada osteocalcina. Necesitan vitamina K para su formación. La osteocalcina es sintetizada por los osteoblastos y las plaquetas, depende de la vitamina K y D. Se considera un marcador de la formación y del remodelado óseo.
- **Glicoproteínas: Osteonectina,** representa el 25% de las proteínas no colágenas, es necesaria para la mineralización normal. Tiene afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. La **fosfatasa alcalina**, es un marcador de la actividad osteoblástica. Las **proteínas con RGD**, reconocidas por las integrinas de los osteoblastos y osteoclastos, permiten la adhesión de las células a la matriz extracelular.

- **Factores de crecimiento:** representan menos del 1% de las proteínas no colágenas, aunque son las principales reguladoras del metabolismo óseo⁽²⁾. Son IGF-I y II, TGF- β , PDGF.

En la siguiente tabla se resumen las proteínas de la matriz osteoide. (Tabla 1)

COLÁGENO	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo I, III, V, XII
PROTEOGLICANOS	<ul style="list-style-type: none"> • condroitin sulfato • decorina • biglicano • hialuronano
PROTEÍNAS CON ÁCIDO γ-CARBOXI-GLUTÁMICO	<ul style="list-style-type: none"> • osteocalcina • proteína de la matriz con ácido γ-carboxi-glutámico
GLICOPROTEÍNAS	<ul style="list-style-type: none"> • osteonectina • fosfatasa alcalina • proteínas con RGD: <ul style="list-style-type: none"> - fibronectina - trombospodina - osteopontina - vitronectina - sialoproteínas óseas
PROTEÍNAS DEL PLASMA	<ul style="list-style-type: none"> • ALBÚMINA • α2-SH- glicoproteína
FACTORES DE CRECIMIENTO	<ul style="list-style-type: none"> • IGF-I y II (Insulin growth factor I y II) • TGF-β (Transforming growth factor -beta) • PDGF (Platelet derived growth factor)

Tabla 1 : Proteínas de la matriz osteoide. (Tresguerres et al, 2006)

1.1.2.3 Células

En el tejido óseo existen tres tipos celulares típicos:

Osteoblastos

Son las células generadoras de hueso. Tienen un tamaño grande (20-30 micras), con citoplasma basófilo y con importante aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso. Son los encargados de sintetizar la matriz orgánica o sustancia osteoide (2-3 micras al día) y expresan la fosfatasa alcalina que permite la mineralización (1-2 micras por día). Tienen una vida media de 1-10 semanas y pueden desaparecer o transformarse en células de revestimiento a lo largo de la

superficie endóstica o perióstica, protegiendo la superficie ósea, o en osteocitos. Sintetizan proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, dirigen la disposición de las fibras de la matriz extracelular, intervienen en la mineralización de la sustancia osteoide por la fosfatasa alcalina y sintetizan factores de crecimiento como el IGF-I y citoquinas que median en la reabsorción desarrollada por los osteoclastos. ^(2,4)

Osteocitos

Son osteoblastos que han quedado encerrados en la sustancia osteoide calcificada que han producido.⁽⁵⁾ Se encuentran alojados en unas lagunas denominadas osteoplasmas y se relacionan unos con otros y con las células del endostio y del periostio, con osteoclastos y osteoblastos de la superficie ósea, con células de la médula ósea, a través de sus prolongaciones situadas en el interior de los canalículos óseos⁽⁶⁾. Los osteocitos tienen forma estrellada y son muy abundantes, más del 90% de las células óseas son osteocitos.⁽⁵⁾ Participan en la síntesis y mineralización de la sustancia osteoide y modulan la respuesta remodeladora frente a los estímulos mecánicos mediante mensajeros químicos paracrinicos como el RANKL y la esclerostina que regulan localmente la reabsorción y la formación ósea. También liberan efectores endocrinos como el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) que regula a nivel renal la homeostasis del fosfato y vitamina D y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), que no solo promueve la formación y crecimiento óseo sino que también aumenta la reabsorción, y es un mediador de la formación ósea en respuesta a PTH.⁽⁷⁾

Los osteocitos controlan la integridad estructural del hueso y la homeostasis del calcio, fósforo y otros minerales. Presentan receptores de membrana específicos como el CD44, entre otros.

El osteocito detecta y responde a los estímulos hormonales y mecánicos y coordina la función de osteoblastos y osteoclastos. Los mecanismos moleculares por los que los osteocitos regulan la homeostasis ósea son poco conocidos.⁽⁵⁾

El proceso de formación de osteocitos es algo que durante mucho tiempo se ha considerado como un fenómeno aleatorio, sin embargo algunos osteoblastos podrían ser incitados a extender sus prolongaciones citoplasmáticas y contactar con otras células vecinas diferenciándose a osteocitos. La expresión de proteínas de membrana E11 y metaloproteinasa MMP14 también conocida como MT1-MMP son necesarios para la formación de los procesos dendríticos de los osteocitos y los canalículos por lo que parece que la osteocitogénesis es un proceso activo conducido por cambios en la expresión génica.

Como ya se ha comentado, los osteoblastos maduros tienen tres posibles destinos, por un lado transformarse en osteocito, por otro, en células de recubrimiento y por otro, la apoptosis. Por tanto cualquier estímulo que altere alguno de estos destinos puede influir en la osteocitogénesis, en este sentido, si se inhibe la apoptosis por administración intermitente de paratohormona (PTH), se incrementa la densidad de osteocitos, aunque no se conoce si el efecto de la hormona se acompaña de cambios en la expresión de genes requerida para la transformación de osteoblastos en osteocitos.

Los osteocitos expresan la mayoría de los genes expresados por osteoblastos aunque en niveles diferentes. La expresión de fosfatasa alcalina y de colágeno tipo I, es más baja, mientras que la expresión de osteocalcina es mayor en los osteocitos, al igual que los genes relacionados con la mineralización y el metabolismo del fósforo como la endopeptidasa neutral reguladora del fósforo (PHEX), la proteína de la matriz de dentina (DMP1), la fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (MEPE) y el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) y los relacionados con la formación ósea como Dkk1 que también se encuentra en los osteoblastos, y SOST expresado principalmente en osteocitos y no en osteoblastos.⁽⁵⁾

Hoy día se sabe que los osteocitos juegan un papel importante en la regulación de la formación ósea. Segregan esclerostina que es un potente inhibidor de la formación ósea y que antagoniza a varias BMPs. La esclerostina y la proteína Dkk1 unido a los correceptores de la superficie celular (LRP5 y LRP6 con capacidad para unirse a proteínas Wnt y mediar en la vía de señalización canónica de Wnt), previenen la activación de la señal de Wnt. BMPs y Wnt son fundamentales para la generación y función de los osteoblastos. Por tanto los osteocitos expresando antagonistas de BMPs y Wnts son potentes reguladores de la formación y activación de los osteoblastos.⁽⁵⁾

Además, los osteocitos intervienen en la respuesta adaptativa del esqueleto a la estimulación mecánica mediante una disminución de la esclerostina que desencadena la señal de Wnt.

Los osteocitos también intervienen en la reabsorción ósea a través del RANKL y OPG. La apoptosis de los osteocitos puede estimular de forma indirecta,

la osteoclastogénesis induciendo la producción de RANKL por osteoblastos o produciéndolo ellos mismos. También los osteocitos producen OPG, que compete con el RANKL con su receptor RANK en los precursores de osteoclastos y M-CSF por lo que los osteocitos tienen un papel importante en el control de la reabsorción ósea regulando la diferenciación y la función de osteoclastos, directa o indirectamente.

La morfología de los osteocitos depende de la expresión de genes relacionados con la formación y ramificación de las dendritas como E11/gp38, CD44 y frimbrina. Las prolongaciones citoplasmáticas son unas 50 de media en el osteocito del hueso humano, y establecen comunicaciones con las de osteocitos vecinos, y con otras células como las de recubrimiento, osteoblastos y osteoclastos y con células de los vasos sanguíneos.⁽⁵⁾

Estas células tienen larga vida pero al igual que osteoblastos y osteoclastos mueren por apoptosis. La apoptosis de los osteocitos se relaciona con el déficit de estrógenos. Hoy día se sabe que la disminución en la viabilidad de los osteocitos acompaña a la fragilidad ósea unida al déficit de estrógenos, también al exceso de glucocorticoides, el envejecimiento y la falta de actividad. ⁽⁵⁾

Osteoclastos

Son las células encargadas de la reabsorción ósea. Son células grandes de hasta 100 micras y multinucleadas. Son ricas en mitocondrias cerca del borde en cepillo y aparato de Golgi alrededor de los núcleos. El citoplasma presenta vacuolas. Tienen receptores para calcitonina, que tiene efecto inhibitorio sobre los osteoclastos.

Tienen dos zonas diferenciadas en su membrana, por un lado un borde en cepillo en contacto con el hueso y donde se produce la reabsorción y otra zona filamentosa con integrinas que sirven de anclaje a la matriz.

Derivan de los precursores hematopoyéticos de la línea monocito/macrófago, llamadas Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos. Para que se produzca la diferenciación es necesario la presencia de M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos) producido por los osteoblastos y el ligando del receptor para la activación del factor nuclear Kappa-B (RANKL). Es conocido que la regulación de la osteoclastogénesis depende de tres moléculas: osteoprotegerina (OPG) (sintetizada por los osteoblastos y preosteoblastos), el RANKL (en la superficie de osteoblastos y preosteoblastos) y RANK receptor del ligando anterior en la membrana de los osteoclastos. La interacción de RANK y RANKL estimula la reabsorción por activación de osteoclastos. Por otro lado, la osteoprotegerina (OPG) inhibe la acción del RANKL, de manera que al unirse la OPG a RANK inhibe la diferenciación osteoclástica.

De esta manera se pone de manifiesto el papel de los osteoblastos en el inicio de la reabsorción ósea y la regulación de la reabsorción ósea a través de RANKL/RANK/OPG. ^(2,8).

1.1.3 Remodelado óseo

El hueso está en constante reabsorción y formación de forma que se produce una renovación anual del 5-15% del hueso total.⁽²⁾ El balance del remodelado es positivo hasta los treinta años, a partir de este momento la masa ósea se mantiene hasta los cincuenta años, momento en el que empieza a tener un

balance negativo. El tejido óseo, gracias al remodelado, tiene capacidad de restituirse totalmente tras una lesión y mantiene la homeostasis de metabolismo fosfo-cálcico.

Para que esta regeneración se produzca intervienen vasos sanguíneos, células y matriz extracelular. Se puede considerar la colocación de un implante como una agresión al tejido óseo que va a desencadenar el proceso de regeneración. Se producirá una respuesta inflamatoria, un hematoma, se liberarán interleuquinas y factores de crecimiento que desencadenan toda la cascada de remodelación. El crecimiento óseo en la superficie del implante va a depender de la actividad de las células óseas diferenciadas.

En el proceso de remodelado óseo intervienen gran variedad de factores que actúan a nivel sistémico y factores que actúan a nivel local.

Entre los **factores** reguladores a nivel **sistémico** del proceso de remodelado óseo están: factores mecánicos, genéticos, vasculonerviosos, nutricionales y hormonales (hormona tiroidea, parathormona, calcitonina, calcitriol, andrógenos, estrógenos, progesterona, insulina, glucocorticoides, hormona de crecimiento).

Dentro de los **factores locales**, actúan los factores de crecimiento (IGF-I y II, TGF- β , PDGF, FGF, EGF, VEGF, las proteínas morfogenéticas (BMPs), las citoquinas (interleuquinas, el interferón y prostaglandinas). En la tabla 2 se muestra la regulación del remodelado óseo mediante estos factores.

	Estimula la formación	Estimula la reabsorción	Inhibe la reabsorción
Factores de crecimiento	BMP-2 BMP-4 BMP-6 BMP-7 IGF-I IGF-II TGF-β FGF PDGF	TNF EGF PDGF FGF M-CSF GM-CSF	
Citoquinas		IL-1 IL-6 IL-8 IL-11 PGE₁ PGE₂ PGG₂ PGI₂ PGH₂	IFN- γ IL-4

Tabla 2: Regulación del remodelado óseo por factores locales. Tomado de Tresguerres et al, 2006.

El conjunto de osteoblastos y osteoclastos actuando de forma coordinada en una superficie ósea dando lugar al remodelado se denomina unidades multicelulares básicas o BMU (*basic multicelular units*). El proceso comienza con la reabsorción y posteriormente tiene lugar la formación ósea. Existen 35 millones de unidades y la vida media de cada unidad es de 2 a 8 meses y cada año se activan 3-4 millones por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años. ⁽⁹⁾

Se diferencian varias fases en el remodelado⁽¹⁰⁾. EL remodelado comienza con la **fase quiescente**, cuando el hueso está en reposo y continúa con la **fase de activación** en la que se retraen las células de la superficie endóstica dejando libre la membrana que será digerida por las colagenasas. Los osteoclastos circulantes de los vasos próximos son atraídos a la superficie mineralizada que ha quedado expuesta. Una vez en la zona, comienza la **fase de reabsorción** en la que los

osteoclastos disuelven la matriz mineral y la matriz osteoide ayudados por los macrófagos. Se liberan los factores de crecimiento de la matriz especialmente TGF- β (factor transformante del crecimiento beta), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) IGF-I y II (factor similar a la insulina I y II).⁽¹¹⁾ Al tiempo que se produce la reabsorción, tiene lugar la **fase de formación**, los pre-osteoblastos son atraídos a la zona por los factores de crecimiento, sintetizan sustancia cementante y expresan las BMPs (proteínas morfogenéticas óseas) para su diferenciación. Posteriormente, una vez diferenciados, sintetizan la sustancia osteoide y comenzará a los 30 días del depósito de matriz, la **fase de mineralización** que se prolongará durante 90 días en el hueso trabecular y 130 días en el hueso cortical. Pasado este tiempo se pasa de nuevo a la fase inicial quiescente.⁽⁹⁾

El proceso de remodelado se puede valorar clínicamente mediante marcadores bioquímicos. Existen indicadores de formación ósea como la fosfatasa alcalina (FA), la fosfatasa alcalina ósea (FAO), el procolágeno tipo I (propéptido C-terminal y N-terminal) y la osteocalcina (OCN) y también marcadores de reabsorción ósea en el suero como son la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), el telopéptido C-terminal y N-terminal del colágeno tipo I. Los marcadores de reabsorción ósea en orina son la excreción urinaria de calcio, hidroxiprolina, piridinolina (Pir), deoxipiridinolina (Dpir), Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP) y telopéptido N-Terminal del colágeno tipo I (NTX).⁽¹²⁾

1.1.4 Regeneración y reparación ósea

En el proceso de curación de un tejido tras una agresión se pueden dar dos procesos diferentes:⁽¹³⁾

- *Reparación:* el tejido reparador no conserva ni la arquitectura, ni la función, ni las propiedades, ni las características del tejido original.
- *Regeneración:* el tejido nuevo es similar a la original y no hay diferencias con el tejido circundante.

1.1.5 Mecanismos relacionados con la regeneración ósea

La osteoinducción, la osteoconducción y la osteointegración son fenómenos que se relacionan entre sí pero que son diferentes aunque, en ocasiones, se confunden.⁽¹³⁾

1.1.5.1 Osteogénesis

Creación de hueso nuevo mediada por el trasplante en el material de relleno de células vivas, que desarrollan la regeneración de forma directa,⁽¹⁴⁾ a través de las células competentes, los osteoblastos. Se consigue con injertos óseos autólogos.

1.1.5.2 Osteoconducción

Un material poroso sirve de guía para el crecimiento óseo y permite que se deposite hueso nuevo que regenera la zona dañada impidiendo que el tejido conjuntivo crezca hacia el interior del defecto.^(13,15) El material puede ser permanente o reabsorbible. La formación de hueso comienza siempre en la periferia.⁽¹⁴⁾ Este proceso aparece en el proceso de curación tras la colocación de implantes óseos.

1.1.5.3 Osteoinducción

Gracias a este fenómeno, células primitivas, pluripotenciales indiferenciadas son de alguna manera, estimuladas para transformarse en células de linaje óseo. La osteoinducción incluye los procesos que ponen en marcha la osteogénesis.⁽¹⁵⁾ Consiste en el reclutamiento y la estimulación de células

inmaduras, pluripotenciales, que se transformarán en preosteoblastos. En el proceso de osteoinducción intervienen las proteínas morfogenéticas (BMPs) de las que existen al menos 20 diferentes siendo la 2 y la 7 las más interesantes y los factores de crecimiento, siendo imprescindible un aporte sanguíneo adecuado.^(13,15) Por otra parte, estímulos físicos como el estrés o señales eléctricas pueden influir en la inducción ósea. La mayor parte del proceso de regeneración ósea depende de la osteoinducción.⁽¹⁵⁾ El proceso comienza inmediatamente después de la agresión y se mantiene durante la primera semana.

1.1.5.4 Osteointegración

Este término fue introducido por Brånemark en 1977 que lo definió como “conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo ordenado y la superficie de un implante sometido a carga funcional.”

Se conoce como la unión estable entre el hueso y el implante por contacto directo entre ellos a nivel de microscopía óptica. Histológicamente se habla de unión entre hueso e implante sin que se interponga en su interfase tejido fibroso. Biomecánicamente es una fijación rígida al hueso, de un material aloplástico, que se mantiene durante la función.⁽¹⁵⁾ La osteointegración se basa, por tanto, en consideraciones biomecánicas y estructurales.⁽¹⁶⁾

En la interfase hueso-implante existe una delgada capa de unos 20-40 hasta 500 micras de grosor, no visible a microscopía óptica. Algunos autores describen la presencia de colágeno y calcio en esa zona. Se habla de interfase amorfa celular entre implante y hueso donde tiene lugar una absorción molecular, una adhesión celular y una matriz mineralizada en la superficie del implante.⁽¹⁶⁾

La colocación de un implante implica una herida quirúrgica en el hueso. La zona dañada tiene que ser reparada para que se produzca la osteointegración. Si se produce alguna interferencia se formará tejido fibroso en lugar de tejido óseo. Este proceso de cicatrización se divide en tres períodos:

a. Período cicatricial: se prolonga durante tres meses. Y se divide a su vez en dos etapas:

La fase cicatricial primaria durante las seis primeras semanas, a consecuencia de la activación de citoquinas y factores de crecimiento. Se produce una regeneración vascular y la reparación ósea tarda unos diez o veinte días. Al mismo tiempo, comienza la formación ósea por osteoblastos y osteoclastos que proceden o de células remanentes vivas o del periostio cercano o de células mesenquimales indiferenciadas.

La fase de compactación laminar es la siguiente y dura hasta dieciocho semanas después de la cirugía. Es una fase de formación rápida de hueso (10 micras al día), Los vasos quedan encerrados y se forma una osteona primaria que puede soportar carga. El hueso es de tipo compacto, sin estructura haversiana.

Al final de este periodo existe una mineralización primaria. Los osteoblastos han depositado el 70% del mineral que hay en el hueso maduro.

b. Periodo remodelativo-madurativo: la *fase de remodelación* implica un cambio en el tejido ya formado. Se ha puesto en marcha el proceso de remodelado, fases de reabsorción activa, fase de inactividad y fase de formación. La fase de reabsorción se inicia con la tunelización por osteoclastos y se prolonga durante dos semanas. Pasado este tiempo hay otras dos semanas de inactividad.

Se continúa con la activación de osteoblastos, el frente de aposición avanza a una velocidad de 25 micras diarias regenerando la cavidad en unas 13 semanas. El vaso sanguíneo que penetró en el túnel queda rodeado de hueso y se forma un canal que es el conducto de Havers. La remodelación ha formado las osteonas secundarias con borde festoneado en el que se encuentra una capa de proteoglicanos formando una línea conocida como línea de cemento entre el hueso nuevo y el neoformado. Alrededor del implante los proteoglicanos serán el contacto entre la superficie del implante y los elementos celulares.

Esta estructura es visible a microscopía electrónica, con el microscopio óptico se observa el implante en contacto con el hueso.

Durante la *fase de maduración*, la remodelación sigue pero con menor intensidad. Las fuerzas oclusales hacen que las trabéculas periimplantarias se orienten siguiendo las líneas de tensión aumentando la resistencia.

Durante esta fase se deposita el 30% de mineral que falta y la mineralización se produce por crecimiento cristalino acelular. Durante los primeros seis meses se pierde altura en el hueso marginal que pasado un año es de 0,9 a 1,6 mm.

c. Periodo de estabilización: el hueso continúa remodelándose, adaptándose a las cargas recibidas. Se produce una pérdida menor del hueso marginal, alrededor el 0,05-0,2 mm al año.

1.2 FACTORES DE CRECIMIENTO

1.2 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son polipéptidos, mediadores metabólicos, promotores del crecimiento y secretados por distintos tejidos, que actúan, a bajas concentraciones, sobre células diana modulando sus funciones, especialmente crecimiento, diferenciación y proliferación celular. ^(17,18) Son sustancias que se localizan en zonas donde el esqueleto sufre una lesión y que juegan un papel importante en el proceso de reparación.⁽³⁾ La liberación de factores de crecimiento y la activación de los procesos de reparación se desencadena ante cualquier noxa que altere el tejido óseo. ⁽¹³⁾

Gracias a los avances tecnológicos, se han podido identificar diversos factores de crecimiento que intervienen en los procesos de regeneración óseas como proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factor de crecimiento transformante beta, (TGF- β), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I y II), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF).^(17,3) jugando un papel muy importante en la regulación de los procesos de reabsorción y formación óseas.

La mayoría de ellos son moléculas de alto peso molecular al ser liberados y posteriormente sufren un proceso de hidrólisis resultando una moléculas activas de menor peso molecular.⁽¹³⁾

Los factores de crecimiento son producidos por distintos tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales y leucocitos, especialmente monocitos y macrófagos. Los factores son almacenados en las plaquetas (gránulos alfa) y en el hueso (inmersos en la matriz ósea). ⁽¹³⁾

A continuación se describen los factores de crecimiento, relacionados con la curación y la regeneración ósea, salvo la IGF-I que se desarrollará más adelante.

❖ **Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)**

Se describen 20 tipos diferentes dentro de esta familia y todos excepto la BMP-1 pertenecen a la superfamilia de TGF- β . La BMP-1 es una proteasa que actúa en la etapa embrionaria. La BMP-3 inhibe la osteogénesis.⁽¹⁹⁾

Se relacionan con la formación ósea endocondral. Las BMP son secretadas por los osteoblastos durante su diferenciación. También las secretan los macrófagos durante la reparación de fracturas. Se relacionan con los procesos de curación y la diferenciación de células precursoras a osteoblastos, aunque no tiene efectos sobre las células maduras. Se consideran osteoinductivas, excepto BMP1 y 6, transformando el tejido conjuntivo en tejido óseo.⁽⁹⁾ Su síntesis no solo se limita al hueso, sino que también se produce en otros tejidos jugando un papel importante en el desarrollo de órganos y en la función celular.⁽¹⁹⁾

La BMP-2, la 4 y la 7 son las más importantes en la regulación de la diferenciación y función de los osteoblastos. Controlan la diferenciación y reclutamiento de células osteoprogenitoras y favorecen el remodelado óseo, ya que RANKL y CSF-GM son productos de los osteoblastos determinantes para la osteoclastogénesis, al estimular la maduración de los osteoblastos, la BMP, de forma indirecta induce la osteoclastogénesis. Además también influye en la transcripción de la osteoprotegerina.⁽¹⁹⁾

Interactúan con dos receptores el tipo I (A y B) y el tipo II, e induce la osificación endocondal y la condrogénesis.⁽¹⁹⁾

Se ha estudiado la utilidad de la BMP-2 por ejemplo en implantes inmediatos.⁽²⁰⁾ En la actualidad la BMP-2 está comercializada con el nombre de INFUSE®

❖ **Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)**

Recibe este nombre porque se encontró por primera vez en las plaquetas. Allí se almacenan dentro de los gránulos alfa. También lo producen otras células como los macrófagos, células endoteliales, monocitos, fibroblastos, encontrándose también en la matriz ósea.⁽¹³⁾

Su principal actividad es mitogénica.⁽³⁾ Por un lado estimula la síntesis de proteínas por parte de los osteoblastos y por otro favorece la reabsorción ósea.⁽⁹⁾

Además realizan las otras muchas funciones como participar en la glucogénesis, regular el crecimiento y diferenciación celular en el sistema nervioso central durante el desarrollo, favorecer la cicatrización,^(13,21) (induce la mitogénesis, la angiogénesis, la producción de proteínas de la matriz extracelular y la quimiotaxis de fibroblastos, monocitos, células musculares y macrófagos y estimula la fagocitosis en monocitos y neutrófilos). Asimismo, estimula la producción de fibronectina y ácido hialurónico. Se relaciona con la hipertrofia gingival tras la toma de fenitoína. Además puede estimular las somatomedinas y aumentar la regeneración periodontal.⁽¹³⁾

❖ **Factor de crecimiento Transformante (TGF)**

Se identificó por primera vez como un factor que transformaba los fibroblastos en células tumorales, alterando su fenotipo. Se trataba de una mezcla de dos proteínas TGF- α y TGF- β

EL TGF- α lleva a cabo las siguientes funciones biológicas: aumenta la proliferación y la migración de las células epiteliales, libera iones calcio del hueso, inhibe la actividad de los osteoblastos, tiene efecto angiogénico, favorece el desarrollo de tumores por un mecanismo autocrino, estimulando la proliferación celular y por uno paracrino induciendo la angiogénesis tumoral.⁽¹³⁾

El TGF- β es producido por osteoblastos y se almacena en la matriz ósea. La reabsorción osteoclástica aumenta los niveles de TGF- β . Es un potente estimulador de la formación ósea e inhibidor de la destrucción de hueso ya que reduce la formación y diferenciación de osteoclastos, así como la función de osteoclastos maduros.⁽⁹⁾

Inhibe la síntesis de esteroides adrenales, controla la hormona folículo estimulante, realiza una transformación fenotípica de fibroblastos, regula la embriogénesis y la diferenciación, controla la proliferación de células mesenquimales, epiteliales, endoteliales y transformadas y las interacciones de la matriz extracelular. Entre sus funciones también está la inmunosupresión.⁽¹³⁾ En líneas generales se dice que estimulan las células mesenquimales e inhiben la ectodérmicas.⁽⁹⁾

La aplicación exógena estimula la reparación ósea potenciando la capacidad osteoinductiva de las proteínas morfogenéticas⁽³⁾

❖ Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Controla la proliferación, diferenciación y otras funciones en las células derivadas del mesodermo y neuroectodermo. Existen dos tipos, el FGF ácido y FGF básico.⁽¹³⁾

Están presentes en la reparación normal de una fractura.⁽³⁾ Entre sus acciones biológicas está la estimulación de la angiogénesis favoreciendo la mitosis y migración de las células endoteliales, estimula la mitogénesis de varios tipos celulares durante el crecimiento, mantenimiento y reparación tisular.^(3,13) Es un anabolizante óseo.⁽⁹⁾ Están ligados a la proliferación y actividad sintética de osteoblastos y condrocitos, aunque su efecto sobre la síntesis de colágeno no está claro. Dependiendo de la dosis en aplicaciones exógenas puede inducir o inhibir la reparación ósea.⁽³⁾

❖ Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Se aisló en cultivos celulares de hipófisis. Su secuencia de aminoácidos tiene un 24 % de similitud con la de PDGF-B pero tiene distintos efectos biológicos y actúan sobre diferentes receptores.

Tiene acción angiogénica y produce vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular. Se considera uno de los factores más importantes en las primeras fases de la reparación de fracturas y regeneración ósea y en el desarrollo de tumores.⁽⁹⁾ Está relacionado con la fisiología periodontal y con el desarrollo de la periimplantitis.

❖ Factor de crecimiento Epidérmico (EGF)

Los fibroblastos del ligamento periodontal, los preosteoblastos y precondrocitos expresan un alto número de receptores para este factor de crecimiento.

Como acciones biológicas destacan efectos mitogénicos y quimiotácticos en fibroblastos y osteoblastos y células endoteliales.⁽⁹⁾ Tiene efecto dosis-

dependientes. También induce la formación rápida del diente, del tejido de granulación, inhibe la liberación de ácido por la mucosa gástrica. Favorece el aumento de la producción de colágeno.

❖ **Factor estimulante de colonias de granulocito-macrófagos (CSF-GM)**

Juega un papel muy importante en la osteoclastogénesis.⁽⁹⁾

❖ **Factor estimulante de colonia de macrófagos (CSF-M)**

Producido por células del estroma medular y osteoblastos juega un papel primordial en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleares pero sin efecto en la actividad osteoclástica.⁽⁹⁾

❖ **Factor de necrosis tumoral (TNF)**

Estimula la reabsorción in vivo y se relaciona con la pérdida de hueso en los procesos periodontales y en la artritis.⁽⁹⁾

❖ **Activin**

Es una proteína relacionada con las BMPs que estimula la liberación de hormona folículo-estimulante por las células pituitarias y regula la replicación y la diferenciación celular, favorece la osteoblastogénesis, estimula la síntesis de colágeno, y mejora la osteoclastogénesis. Promueve la curación de fracturas y la formación ósea endocondral. Se han descrito cuatro receptores de activin (dos tipo I y dos tipo II).

❖ Wnt

Interviene en la diferenciación de los osteoblastos y en la formación ósea. Tienen efectos similares a los de las BMPs. Fallos en Wnt o en su vía de activación anulan la osteogénesis e incrementan la osteoclastogénesis.

Se describen antagonistas de Wnt que incluyen moléculas secretadas, moduladores transmembranas o señales intracelulares. La anulación de estos inhibidores, en concreto esclerostina y Dkk-1, puede ser una vía futura de desarrollo de agentes anabólicos óseos.⁽¹⁹⁾

1.2.1 Mecanismo de acción

Existen tres mecanismos de acción de los factores de crecimiento:^(22,23)

- **Acción autocrina:** el factor actúa sobre la propia célula secretora o sobre células que presentan el mismo fenotipo.
- **Acción paracrina:** el factor actúa sobre células vecinas con fenotipo diferente a la célula que lo secreta.
- **Acción endocrina:** el factor actúa sobre una célula con fenotipo distinto pero que se encuentran a distancia. Para ello el factor de crecimiento tiene que pasar al torrente sanguíneo.

Las células diana poseen receptores específicos en su membrana,⁽¹³⁾ una vez que el factor de crecimiento se une a ellos se activa un sistema de transducción de la señal, a través de una proteína-quinasa, que llega al núcleo celular y produce una respuesta biológica. Se habla de interacción ligando-receptor que puede ser simple o compleja. Una vez producida la unión comienza la transducción de la señal activándose una proteína intracelular que llega al núcleo, se une al ADN y provoca

la expresión de un nuevo gen o grupo de genes.⁽²²⁾ Debido a este mecanismo de acción los efectos desencadenados por los factores de crecimiento continúan aunque hayan desaparecidos dichos factores del medio ya que se ha activado un sistema de segundos mensajeros.⁽¹³⁾

El proceso se autorregula dependiendo de la cantidad de factor de crecimiento presente, de manera que si se detecta una cantidad excesiva disminuye el número de receptores y si hay una deficiencia de factor de crecimiento, aumentan los receptores disponibles.⁽¹⁷⁾

Las interacciones pueden ser muy variadas, desde uniones simples receptor-ligando a otras más complejas en las que intervienen varios ligandos sobre varios receptores. Además un factor puede interactuar con varios receptores, o varios factores sobre un mismo receptor.⁽²²⁾

En el siguiente apartado se describe la proteína utilizada en este trabajo, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I.

1.2.2 Factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I)

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I es una hormona peptídica que contiene setenta aminoácidos⁽²⁴⁾ en una cadena con tres puentes disulfuro intramoleculares. Su peso molecular es de 7649 daltons. (Fig. 1)

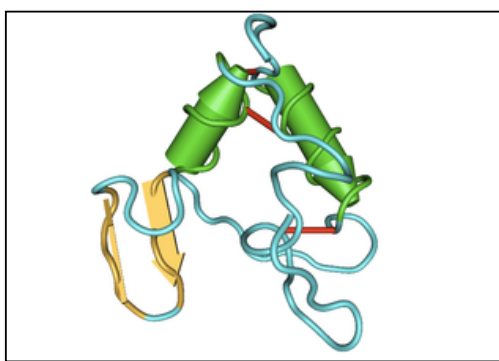


Fig. 1 : Estructura del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I)

Clásicamente se conocía como Somatomedina C, pero posteriormente cambió su nombre por presentar una estructura en cadena simple con una semejanza del 50% en la secuencia de aminoácidos con la proinsulina. ^(17,18,13)

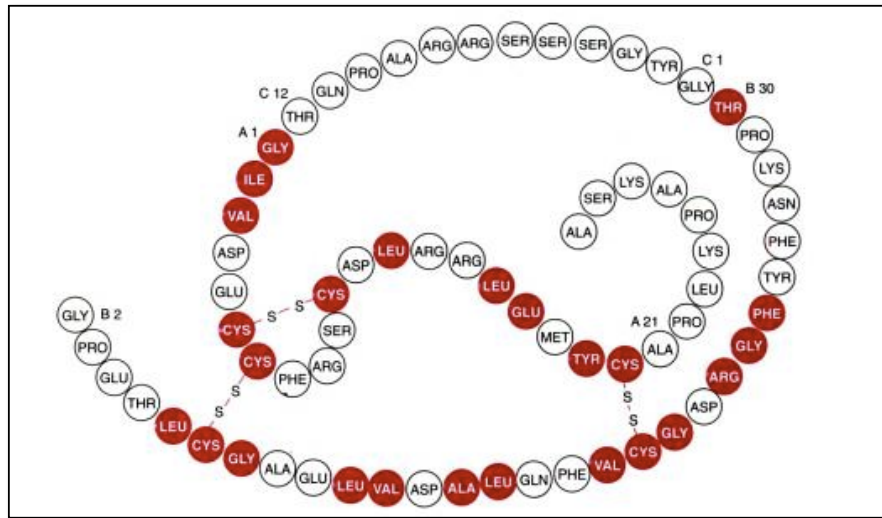


Fig.2 : Secuencia de aminoácidos de IGF-I humana. Tomado de Pombo M. 1997

Las áreas A y B son homólogas a la insulina y la C de 12 aminoácidos análoga al péptido que conecta en la proinsulina. Los tres puentes disulfuro se encuentran en la misma posición que en la proinsulina.

El gen de la IGF-I se encuentra en el brazo largo del cromosoma 12 y tiene 6 exones y 80 Kb.

Es secretado principalmente por el hígado, estimulado por la hormona de crecimiento y por diferentes tipos de células, entre ellas los osteoblastos,^(24,13) siendo el esqueleto la segunda fuente de IGF-I, tanto por la síntesis en los osteoblastos como por la liberación durante la reabsorción, del IGF-I de la matriz proteica.⁽²⁵⁾ También se produce en otros órganos como la placenta, el corazón, el riñón, el páncreas, el intestino delgado y el grueso, el bazo, los testículos, los ovarios, el cerebro, la médula ósea y la hipófisis.

IGF-I y II favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos.^(26,23) Estos factores se encuentran en gran concentración en la matriz osteoide, siendo el IGF-II el factor de crecimiento más abundante en el hueso. ^(22,27) Este factor es importante en el desarrollo esquelético, pero sus funciones en el esqueleto adulto no están probadas.⁽¹⁹⁾ Sus acciones son similares a las del IGF-I aunque 4 a 7 veces menos potente que este en el estímulo celular.⁽²²⁾

Las células óseas también secretan proteínas transportadoras de IGF (IGFBP) que además de transportarlas, modulan su actividad.^(3,27)

1.2.2.1 Regulación de la secreción

Como sabemos la primera fuente de IGF-I es el hígado seguido en segundo lugar por el esqueleto. La regulación de la síntesis de IGF-I va a depender principalmente de la secreción de hormona de crecimiento (GH) y del estado nutricional.

Existe un feed-back entre GH e IGF-I de forma que en situaciones con déficit de hormona de crecimiento, existe una disminución de los niveles de IGF-I, mientras que en pacientes con acromegalia, los niveles de IGF-I están muy elevados. Del mismo modo, cuando existen niveles altos de IGF-I se inhibe la liberación de GH.⁽²⁵⁾

Estados de desnutrición y falta de actividad física también se relacionan con inhibición de la síntesis de IGF-I.

Por su parte, los esteroides sexuales son importantes en el control de la secreción de IGF-I. Esto explica que durante la adolescencia aumenten los niveles de IGF-I de forma paralela a los niveles de hormonas sexuales y al pico de

crecimiento.

Su producción se ve influenciada por el envejecimiento, disminuyendo en el hueso, en un 60%, entre los 20 y 60 años.⁽²⁶⁾

Las concentraciones de IGF-I en el suero fetal y en el cordón umbilical son bajas y aumenta durante la infancia. En la pubertad aumenta de forma importante. Posteriormente desciende manteniéndose constantes en los adultos, secretan unos 30mg de IGF-1 al día hasta los treinta años y posteriormente la producción va disminuyendo con la edad, relacionado con la disminución de los pulsos de GHRH y de la producción de esteroides sexuales.^(28,25)

El rango normal en sangre es muy amplio. Los niveles se ven modificados por la genética, la hora el día, edad, sexo, la actividad física, estrés, nutrición, estado de salud, índice de masa corporal, raza, nivel de estrógenos y consumo de xenobióticos.⁽²⁹⁾

Situaciones patológicas como los problemas tiroideos, la descompensación diabética, los glucocorticoides también alteran las funciones óseas del IGF-I porque disminuyen la síntesis de IGF-I y aumentan la producción de factores inhibidores como la IGFBP-1 y 4.⁽²⁵⁾

También se ha relacionado con procesos cancerígenos, altos niveles de IGF-I y bajos niveles de IGF-I unido a proteína-3 (IGFBP-3) se asocian a un aumento del riesgo de varios cánceres, como el de próstata, mama y colon.^(30,31)

En cuanto a la relación entre los niveles plasmáticos de IGF-I y la densidad mineral ósea distintos estudios confirman una correlación positiva entre ambos factores, de manera que altos niveles de IGF-I sérico se relacionan con aumento de

la DMO,⁽³²⁾ y la disminución de IGF-I sérica con la edad, se asocia a osteoporosis, con disminución de DMO.⁽³³⁾ Además la contribución del IGF-I sérico en el mantenimiento de la integridad de la cortical ósea, se demuestra en experimentación animal, relacionándose la disminución de IGF-I sistémico con una disminución de la cortical ósea y no tanto del hueso trabecular. Mientras que el IGF-I de origen esquelético, local, se relaciona en mayor medida con la integridad del hueso trabecular.⁽¹⁹⁾

La secreción de IGF-I en los osteoblastos está regulada por factores de crecimiento locales y por hormonas⁽²⁶⁾ de manera que la mayoría de las hormonas que actúan sobre el hueso, influyen en la producción de IGF-I. Los efectos anabólicos de PTH se relacionan con aumento de IGF-I,⁽³⁴⁾ el estradiol, algunos factores de crecimiento, proteínas morfogenéticas óseas 2 y 7 y citoquinas como prostaglandinas E aumentan la producción y los glucocorticoides la disminuyen.

1.2.2.2 Mecanismo de acción

El IGF-I se une para realizar sus funciones a dos receptores que son tirosina quinasa. Puede unirse al receptor de insulina, por el que tiene baja afinidad y que es responsable de los efectos metabólicos similares a los de la insulina, favoreciendo la entrada de glucosa en el tejido adiposo y en el músculo, o puede unirse a su receptor específico, el del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGFIR) con alta afinidad. Esta unión es responsable de los efectos mitogénicos.⁽²⁸⁾ Este receptor es una glucoproteína formada por dos subunidades alfa y dos beta dispuesta de forma parecida al receptor de la insulina. El IGF-I es un potente activador de la transducción de señal PKB (proteína Kinasa B), un estimulador del crecimiento y proliferación celular sobre todo en músculo, cartílago, hueso, hígado,

nervios, piel, células hematopoyéticas, pulmón y células nerviosas y síntesis de ADN celular. También es un inhibidor de la muerte celular programada o apoptosis.

Un 99% del IGF-I circula en sangre unido a una **proteína transportadora, IGFBP**, que modula su disponibilidad y sus efectos. De esta forma se prolonga su vida media (18 horas) e inhibe sus efectos hipoglucémicos. Las proteínas transportadoras pueden secuestrar al factor de crecimiento e impedir su interacción con los receptores de las superficies celulares, pero cuando las IGFBP están asociadas a la matriz extracelular, aumentan las concentraciones efectivas de IGF-I potenciando sus efectos.⁽¹⁹⁾ Se han identificado seis de estas proteínas, La IGFBP-1 y la 6 no tienen una función definida en las células esqueléticas. La IGFBP-2 es importante en el transporte de IGF-I pero su sobreexpresión *in vivo* e *in vitro* se relaciona con efectos opuestos a la IGF alterando el crecimiento y disminuyendo la función de los osteoblastos. Efectos inhibitorios similares se han descrito *in vitro* para la IGFBP-5. Por tanto niveles elevados de estas proteínas dan lugar a una disminución de la actividad de IGF-I. ⁽¹⁹⁾

La mayoría (80%), de IGF-I está unido a IGFBP-3 controlado directamente por la hormona de crecimiento. Ambas, IGF y IGFBP-3, unidas a una tercera proteína, producida por el hígado que se denomina subunidad ácido-lábil, forman un complejo ternario de 140.000 daltons.

Las IGFBPs, pueden estimular la función de las células óseas, independientemente de su interacción con IGF-I, pero parece que su papel fundamental es unirse y servir de transporte al factor de crecimiento.⁽¹⁹⁾

También se han identificado un grupo de enzimas, **IGFBP proteasas**, que rompen las proteínas transportadoras (IGFBP) en fragmentos de menor peso molecular y liberan al IGF-I del complejo transportador. Estas proteasas actúan en el espacio extracelular, en tejidos específicos o en el torrente circulatorio,⁽²⁵⁾ y es un importante mecanismo regulador.⁽¹⁹⁾

El IGF-I libre en el suero es el biológicamente activo⁽²⁸⁾ y se elimina rápidamente por el riñón por presentar un bajo peso molecular.

1.2.2.3 Efectos del IGF-I

El IGF-I tiene efectos similares a la insulina, pero se relaciona con otras muchas funciones.

- Presenta actividad mitogénica, anabólica y actúa como factor quimiotáctico de las células del ligamento periodontal⁽¹³⁾ y células óseas.⁽³⁵⁾ Aunque su efecto mitogénico es menor que el otros factores de crecimiento como TGF- β y PDGF-BB.⁽²⁷⁾
- Actúa como mediador de la hormona de crecimiento, que a su vez estimula el hígado para que produzca IGF-I.
- Estimula el crecimiento del cartílago, actúa sobre el condrocito maduro, desempeñando un papel fundamental en la osificación endocondral^(17,3,27), aunque la administración sistémica presenta menor efecto que el IGF-I local en la regulación del crecimiento.⁽¹⁸⁾ Asimismo estimula la condrogénesis en estudios in vitro.⁽³⁶⁾
- Aumenta la longitud ósea y la circunferencia endostal y periostal. ⁽³⁷⁾

- Tiene capacidad de estimular la síntesis de matriz ósea: por estimular tanto la replicación de células osteoprogenitoras como la diferenciación de osteoblastos.⁽³⁸⁾
- Actúa como agente quimiotáctico para células endoteliales aumentando la neovascularización de la herida.⁽¹³⁾ Induce la expresión de VEGF en las células esqueléticas.⁽¹⁹⁾
- Estimula la síntesis de glucógeno en el hígado, siendo 50 veces más potente que la insulina para esta función.
- Juega un papel importante en el crecimiento infantil, presentándose en niveles bajos durante la infancia, aumentando en la pubertad y disminuyendo con el envejecimiento, momento en el cual aparecen bajos niveles séricos y cerebrales.
- Aumenta la síntesis de DNA óseo⁽³⁹⁾, diferenciación celular, y la síntesis de proteínas colágenas (tipo I), es la única hormona junto con la insulina que estimula la síntesis de colágeno en el tejido óseo, interviniendo en la función, mantenimiento, regeneración de muchos tejidos incluyendo las fracturas óseas,⁽¹⁷⁾ además inhibe la degradación del colágeno incrementando la masa ósea por inhibición de la secreción de colagenasa por los osteoblastos,^(27,40) aunque su importancia en el proceso de reparación es menos clara.^(3,41) Por tanto, el incremento de masa ósea se debe tanto a un estímulo en su formación como a la disminución de la degradación.⁽³⁵⁾
- La función de IGF-I en la reabsorción ósea no está clara^(25,19). Según algunos autores aumenta el número de osteoclastos y su función.^(13,19) Otros hablan de un efecto indirecto sobre el osteoclasto a través de factores producidos

por los osteoblastos⁽²⁵⁾ y para otros no tiene efectos sobre la reabsorción ósea.⁽¹⁸⁾ Se ha observado que a dosis bajas, estimula de forma independiente la formación ósea sin inducir reabsorción⁽⁴²⁾. Algunos autores hablan de incremento en la formación ósea y disminución de la reabsorción por inhibición de la osteoclastogénesis a través de la disminución de RANKL.⁽⁴³⁾

En líneas generales el IGF-I tiene un doble papel sobre los osteoblastos, en primer lugar estimula la proliferación y diferenciación de preosteoblastos y posteriormente actúa sobre el osteoblasto diferenciado estimulándolo y favoreciendo la formación y mineralización de la matriz y disminuyendo la degradación del colágeno.⁽²⁵⁾

En experimentación animal se ha demostrado su papel anabólico en el hueso ya que se observa disminución de la DMO si se altera la producción o función de IGF-I y aumento de masa ósea si se aumenta la exposición a IGF-I. Existe por tanto correlación entre los niveles de IGF-I y la DMO.⁽³⁵⁾ Para algunos autores este efecto anabólico necesita la presencia de estrógenos que potencian la acción de IGF-I. Aunque la mayoría detectan aumento tanto de la formación como de la reabsorción.^(25,37)

Los niveles séricos de IGF-I también se relacionan con la DMO en mujeres postmenopáusicas así como un incremento del riesgo de fractura (3 veces más) en mujeres con bajos niveles de IGF-I independientemente de otros parámetros como DMO, edad, duración de menopausia o índice de masa corporal.^(25,19)

Estudios animales, en ratas también relacionan bajos niveles de IGF-I sérico con disminución de masa ósea, que se recupera con la administración de dosis bajas de IGF-I durante solo tres semanas.⁽⁴⁰⁾

Otros autores relacionan bajos niveles de IGF-I en líquido cefalorraquídeo en edades tempranas con la patogenia del autismo por la importancia de este factor de crecimiento en la supervivencia de células de Purkinje en el cerebro.⁽⁴⁴⁾

Las funciones de IGF-I están íntimamente relacionadas con la GH de manera que se habla de un eje GH/IGF-I. La hormona de crecimiento es secretada por la glándula pituitaria anterior, su síntesis es controlada por señales centrales y periféricas. El primer lugar de acción de la GH es el hígado donde va a estimular la producción de IGF-I. Tiene efectos directos en el hígado, el riñón, músculo y también en el sistema nervioso central y hueso. La GH tiene dos mecanismos de acción, uno independiente, a través de su receptor (GHR) presente en la mayoría de las células y otro dependiente, a través de la inducción de la secreción de IGF-I. La mayoría de IGF-I circulante es sintetizada en el hígado, pero se expresa en todos los tejidos, por lo que su efecto paracrino/autocrino parece ser el mayor mecanismo de control del crecimiento tisular.⁽⁴⁵⁾

IGF-I y GH tienen funciones diferentes e independientes y cuando ambos se dan juntos tienen un efecto sinérgico.

1.2.2.4 Uso como agente terapéutico.

Existen alteraciones que producen un déficit de IGF-I o una disminución de la respuesta al él, como el Síndrome de Laron, considerado como una deficiencia primaria de IGF severa, que cursa con niveles normales o elevados de GH, baja estatura, y bajos niveles de IGF. Los pacientes no responden al tratamiento con GH, son tratados con IGF-I recombinante.

Se ha estudiado su aplicación en gran variedad de patologías como problemas de crecimiento, diabetes mellitus 1 y 2, esclerosis lateral amiotrófica, quemados, distrofia muscular miotónica. Dando muy buenos resultados en diabetes pero con algunos efectos adversos y en los estudios sobre esclerosis lateral amiotrófica tampoco se obtuvieron resultados claros por lo que la FDA no aprobó su utilización.

La **mecasermina (Increlex®)** es un análogo sintético de IGF-I que se aplica dos veces al día y que si ha sido aceptado por la FDA en 2005, para el tratamiento de los problemas de crecimiento por déficit severo de IGF-I. También ha sido aceptado Inplex^R que es un complejo IGF-I/IGFBP-3 que se inyecta una vez al día con menos efectos secundarios que el primero. Pero por problemas de patentes el único comercializado en Estados Unidos es Increlex®.

También se ha estudiado su efectividad en tratamientos de accidentes cerebro-vasculares combinado con eritropoyetina vía intranasal en ratones.

Como tratamiento de osteoporosis también se ha probado en ratas en las que se demuestra incremento en la formación ósea y reducción de la diferenciación de osteoclastos por disminución de RANKL.⁽⁴³⁾

Un estudio realizado en ratones demuestra que el IGF-I combinado con alendronato en el tratamiento de la osteoporosis incrementa la densidad mineral ósea total y la femoral en mayor medida que usando el IGF-I solo.⁽³⁷⁾ Sin embargo, no ocurre lo mismo si se compara la combinación de fármacos con el alendronato solo.

La anorexia nerviosa se asocia con pérdida de hueso severa y disminución de los niveles séricos de IGF-I, cuando se normalizan los niveles séricos del factor

de crecimiento y se combina con terapia sustitutiva de estrógenos, incrementa la densidad mineral ósea en estos pacientes.⁽¹⁹⁾

No obstante, la seguridad y los efectos adversos de su utilización durante largos periodos de tiempo están por determinar, además la administración sistémica parece tener un mayor efecto a nivel cortical pero no trabecular, es necesario controlar las dosis y los posibles efectos adversos del aumento de la reabsorción ósea. Otras limitaciones es el coste del tratamiento y la vía de administración (vía parenteral).

1.3 OSTEOPOROSIS

1.3 Osteoporosis

1.3.1 Concepto y diagnóstico

El aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados hace que aumente la incidencia de enfermedades degenerativas como la osteoporosis.⁽⁴⁶⁾

Clásicamente se ha definido la osteoporosis como la pérdida de masa ósea medida en gramos, entendiendo por masa ósea, la cantidad de hueso en un fragmento óseo, ya que esta patología se acompaña de reducción del espesor de las corticales y disminución del número y tamaño de las trabéculas de hueso esponjoso, en ausencia de otra alteración, dando lugar a una disminución de la densidad y la calidad ósea.⁽⁴⁷⁾ Albright fue el primero en dar una definición, hablando de “cantidad de hueso en el hueso”.

Posteriormente se empezaron a tener más en cuenta directrices estadísticas referidas al pico de masa ósea normal del joven, que se compara con la masa ósea del paciente medida a través de la densidad mineral ósea (DMO)⁽⁴⁸⁾ o al riesgo de padecer fracturas patológicas.⁽⁴⁹⁾

En la actualidad, la osteoporosis se puede definir como una patología esquelética multifactorial con un componente genético importante. Se relaciona con la edad y con la presencia de una baja densidad mineral ósea (peso del contenido mineral de un fragmento óseo referido a un área concreta de hueso, se expresa en gramos/cm²) así como un deterioro de la microestructura ósea, que da lugar a un aumento del riesgo de fracturas. Afecta tanto a hombres como a mujeres.⁽⁴⁶⁾ Asimismo se puede relacionar con una composición ósea alterada y aumento del remodelado óseo.^(50,51)

Todos estos aspectos se recogen en la definición propuesta por el National Institute of Health en el 2001 que define la osteoporosis como una enfermedad generalizada del sistema esquelético caracterizada por la pérdida de masa ósea y por el deterioro de la microestructura del tejido óseo, que compromete la resistencia ósea y que condiciona como consecuencia una mayor fragilidad ósea y una mayor susceptibilidad a las fracturas.⁽⁵²⁾ Esta definición tiene dos vertientes importantes, por un lado la cantidad de masa ósea y por otro la calidad del hueso en cuanto a resistencia y fragilidad, sin embargo no tiene aplicación clínica porque no permite identificar a los pacientes que la padecen.⁽⁵³⁾ Es por ello que en el día a día se utiliza la clasificación, con criterios cuantitativos, de la Organización Mundial de la Salud que más adelante se comenta.

Durante el remodelado normal se produce un equilibrio entre los procesos de reabsorción y de formación ósea, en la osteoporosis este equilibrio se rompe apareciendo un balance negativo, en el que predomina la reabsorción ósea, acompañándose de cambios en la microestructura ósea que aumentan la fragilidad del hueso,⁽⁵¹⁾ siendo las fracturas vertebrales la más característica de las fracturas osteoporóticas.⁽⁵⁴⁾

La osteoporosis en si misma no produce dolor, siendo las fracturas la manifestación clínica más importante.⁽⁵³⁾ La incidencia de fractura ósea es la mayor complicación de la osteoporosis⁽⁵³⁾ y es responsable de la mortalidad y morbilidad relacionada con este proceso patológico.⁽⁵⁵⁾

La densidad mineral ósea (DMO), es el valor más predictivo del riesgo de fractura del paciente⁽⁵⁵⁾ y se ve influenciada, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), por factores ambientales, médicos, genéticos y epigenéticos. La OMS ha utilizado valores densitometría de rayos X de doble energía (DEXA) para su

definición, pero también se puede usar la tomografía computarizada cuantitativa (QCT), considerando que existe osteoporosis cuando el contenido mineral óseo (CMO) es menor de 100mg/cm³ en la mujer y de 134 mg/cm³ en el hombre.⁽⁵⁶⁾

A pesar de ser una patología que se puede presentar en ambos sexos, es más frecuente en mujeres, de forma que a partir de los cuarenta años se produce una pérdida constante, de irregular intensidad, de alrededor de 0,5-1,0% anual de masa ósea que ha alcanzado su pico máximo a los 35 años.⁽⁵²⁾ Tras la menopausia, durante 5 a 10 años, se produce una aceleración, pudiendo llegar a perderse entre un 5% y un 8% anual. ⁽⁵⁷⁾ Este hecho hace que entre los 50 y 70 años las mujeres pierdan un 30% de masa ósea frente al 12% de pérdida en los hombres.

Estudios realizados por distintos autores, valorando la pérdida de hueso a nivel oral, sugieren que a cierta edad, 50 años aproximadamente, esta pérdida es mayor en el sexo femenino que en el masculino, acompañándose de una disminución del contenido mineral óseo (1,5% por año en mujeres y 0,9% por año en hombres) y que este hecho puede estar relacionado con la presencia de osteoporosis.^(58,59)

Debido a la gran cantidad de factores que pueden intervenir en la etiopatogenia de la osteoporosis y su poca sintomatología clínica hasta que no aparecen las fracturas, la identificación de personas en riesgo de padecer la enfermedad es complicada y pueden pasar desapercibidas y no ser diagnosticados y tratados de forma precoz.^(52,53)

El diagnóstico hoy por hoy se realiza con pruebas complementarias como la densitometría y/o radiografías que confirman las fracturas.

Para realizar Las mediciones de las distintas variables óseas se han utilizado a lo largo de la historia diferentes técnicas. Los primeros estudios sobre

masa ósea se realizaron en los años sesenta con la **radiogrametría metacarpiana**,^(60,61) posteriormente se empleó la **macrorradiografía** algo más precisa.⁽⁶²⁾ Con ambos métodos solo se puede cuantificar la masa ósea cortical, pero no la trabecular, más activa metabólicamente. Por esta razón surgieron los estudios con isótopos radioactivos, dando lugar al nacimiento de los **absorciómetros**. Existen tres tipos de densitómetros: el más antiguo es la **absorciometría fotónica simple (SPA)**, y posteriormente surgieron la **fotométrica dual (DPA)** y la de **rayos X de energía simple (SXA) o de energía dual (DXA)**. La técnica más extendida es la absorciometría de doble energía de rayos X DXA, sobre todo los de cadera y columna lumbar. Es una técnica precisa, fiable y capaz de predecir fracturas.

El fundamento de la densitometría es la absorción de radiaciones:

- Fotones X, de procedencia electrónica, también llamados rayos X o simplemente radiación.
- Fotones Gamma, radiación electromagnética procedente del núcleo atómico, también llamados radiación gamma.

La radiación puede proceder de una fuente de energía única o de dos y tanto la radiación X como la gamma tienen los mismos mecanismos de interacción con la materia. En densitometría se emplean radiaciones con una energía entre 60 y 140 KeV y dependiendo de la energía y del tipo de material (número atómico), puede ocurrir que el fotón no interaccione, que se produzca un efecto fotoeléctrico o que tenga lugar un efecto Compton. Como consecuencia de la interacción habrá una atenuación del haz primario, que va a depender del grosor y la composición

del tejido, fundamentalmente el grosor del mineral óseo.⁽⁶³⁾ La medición densitométrica se obtiene mediante cálculos matemáticos, basándose en la diferencia de intensidad del haz antes y después de atravesar el cuerpo.

- **Absorciometría fotónica simple:** apareció en los años 60. Se trata de un rayo de fotones monoenergético generado por una fuente de Yodo-125 o Americio-247. Al utilizar un fotón, no se puede separar la atenuación del tejido óseo de la del tejido blando. Sólo se usa en calcáneo o radio donde casi todo el tejido atravesado es óseo.

El grosor total de tejido blando debe ser constante y esto se logra rodeando la extremidad con agua o gel, equivalentes de tejido blando. La medición de la masa ósea viene expresada en g/cm o g/cm². La exactitud de esta técnica es de 3-5% y la precisión es de 1-4%.⁽⁶⁴⁾ Dejó de usarse al desarrollarse los densitómetros de energía de rayos X (SXA) que no necesitan isótopos radiactivos.⁽⁶³⁾

- **Absorciometría fotométrica dual:** utiliza una fuente de energía de fotones doble, lo que permite la transmisión simultánea de dos diferentes energías, y la diferenciación de la atenuación de los tejidos blandos y la del tejido óseo.⁽⁶³⁾ No se necesita un grosor de tejido blando constante y se puede determinar la densidad mineral ósea punto por punto y tras la suma obtener el contenido mineral total. Se puede usar tanto en hueso periférico(antebrazo) como axial(cadera y columna).

Los resultados se expresan como contenido mineral óseo total, en gramos o en g/cm o g/cm². La fuente suele ser el Gadolinio-153, elemento que naturalmente emite en dos niveles de radiación. Produce una alta dosis de radiación y es un procedimiento lento.⁽⁶⁵⁾ La exactitud es del 5% aproximadamente y la precisión sobre el 2%.⁽⁶⁶⁾ Dejó de utilizarse al aparecer la absorciometría dual de rayos X.

- **Absorciometría de rayos X de energía dual (DXA):** emplea un tubo de rayos X para producir dos rayos de energía con fotones. Las imágenes que obtenemos son de alta resolución, ya que el tubo de rayos X produce una corriente de fotones mucho mayor que la fuente de radiación convencional, por lo que el rayo puede ser altamente colimado. El tiempo de rastreo es menor, disminuye la radiación para el paciente y el coste por examen. Además obtenemos una mayor precisión.^(67,63) El tiempo medio para una valoración es un 60% menor y la precisión alcanza un 1%.

Al igual que la absorciometría de doble fotón, es posible evaluar el componente graso y no graso del organismo humano. Además permite estudiar animales de experimentación.⁽⁶⁵⁾

Hoy en día es el método de elección en las medidas de masa ósea más frecuentes en clínica: columna, cuello femoral y seguimiento de cicatrización ósea tras fracturas óseas.

La densitometría mineral ósea dual con fuente de rayo X (DEXA) lumbar anteroposterior y fémur proximal se considera el método por excelencia para medir la DMO. Estos aparatos tienen gran exactitud, precisión, reproducibilidad y emplean bajas dosis de radiación. Los resultados de masa ósea se indican en g/cm², contenido mineral óseo en gramos, área en cm², altura y grosor en centímetros.

El aparato también nos proporciona los valores de referencia de DMO en función de la edad y otra tabla con los valores T-score y Z-score de las localizaciones analizadas y los porcentajes respecto al adulto joven y respecto al grupo de edad y sexo.⁽⁶³⁾

Algunos aparatos permiten la proyección lateral que, aunque es menos reproducible que la anteroposterior, permite medir el cuerpo vertebral excluyendo

arcos posteriores y osteofitos anteriores por lo que la artrosis vertebral no interfiere la medida.⁽⁶³⁾

- **Densitómetros periféricos**

Para mejorar sus prestaciones aparecen en el mercado los **aparatos periféricos** de menor tamaño y coste, baja radiación o nula, en caso de ultrasonido y no precisan personal especializado. Pueden ser útiles para evaluar el riesgo de fractura y para decidir en que pacientes se debe hacer una DEXA axial y en cual no. Sus limitaciones son que no hay criterios uniformes para realizar el diagnóstico y no permite el seguimiento de pacientes.

Dentro de los densitómetros periféricos distinguimos unos de absorciometría de rayos X simple, y otros de rayos X doble (pDXA). La simple utiliza una radiografía de mano con una placa de alta precisión, la imagen se digitaliza y se analiza. Entre los dexa periféricos, encontramos la absorciometría digital computarizada de doble energía de rayos X (CDA) que mide la masa ósea del tercer dedo de la mano no dominante. Tiene una alta precisión (1%) y ha demostrado efectividad en la predicción de fracturas vertebrales y de cadera.⁽⁶³⁾

- **Tomografía cuantitativa computarizada**

Otros métodos de medición de la DMO es la **tomografía cuantitativa computarizada, (QCT)**. Es la única técnica tridimensional volumétrica, para medir densidad mineral ósea. Permite la separación espacial del hueso cortical y el trabecular y mide densidad real en el hueso. Los resultados se expresan en g/cm³. Requiere mayor radiación y la grasa del paciente influye en el resultado y son más caros y menos precisos y exactos que el DEXA de columna postero-anterior.⁽⁶⁸⁾ La diferencia de la DMO con la edad es mayor con el TCC que con el DXA.⁽⁶³⁾ Se acepta

para medir columna lumbar exclusivamente. Tiene buen valor predictivo de fractura vertebral.

- **Ultrasonido**

El **ultrasonido (BUA)** permite estudiar la calidad ósea. Normalmente se realiza en el talón. Hay autores que lo incluyen dentro de los periféricos, sin embargo no tienen fuente radiológica y presentan unas características que lo diferencian.

Por un lado valora la velocidad del sonido y por otro la atenuación ultrasónica. Como la velocidad del sonido en el hueso está relacionada con la variable de elasticidad y con la densidad, el ultrasonido puede también brindar información estructural del hueso, analiza aspectos de la microarquitectura. Además es un método libre de radiación, que necesita poco tiempo para el estudio y de bajo coste.^(65,69)

En la siguiente tabla se resume las distintas técnicas y los lugares de aplicación. (Tabla 3)

TÉCNICAS DENSITOMÉTRICAS	LOCALIZACIÓN
Absorciometría fotónica simple	Calcáneo, radio
Absorciometría fotónica dual	Columna, cadera, antebrazo
Absorciometría radiológica simple	Antebrazo, mano
Absorciometría de doble energía de RX	Columna, cadera, antebrazo, mano
Tomografía cuantitativa computarizada	Columna, cadera, antebrazo
Densitometría por ultrasonidos	Calcáneo, rótula

Tabla 3 : Técnicas densitométricas y lugares de exploración. (Tomado de Ibáñez R. 2003)

Otras pruebas complementarias son las **radiografías**, se indican cuando hay sospecha de fractura, ya que en ausencia de ellas no tienen utilidad para apreciar cambios en la densidad mineral ósea.

En la tabla 4 se recogen las características de los distintos métodos de medición de masa ósea. (Tabla 4)

	Radiación (mRem)	Precisión(%)	Tiempo de exploración	Coste
SXA	10-20	1-2	15	+
DXA	1-5	0,5-2	3-7	++
QTC	60	2-5	10-15	+++
BUA	0	0,4-4	3-7	+
RX simple	700			+

Tabla 4 : Características de las distintas técnicas de medición de masa ósea.

SXA: Absorciometría radiológica simple; DXA: Absorciometría de doble energía de rayos X; QTC: tomografía cuantitativa computarizada; BUA: ultrasonografía. (Tomado de Ibáñez 2003)

La DMO es uno de los factores que determinan la calidad ya que ésta depende del concepto global de resistencia o solidez del hueso que es lo que marca el riesgo de fractura. En la resistencia influyen la mineralización, conservación del tejido trabecular y conectivo, estado de la microestructura, grado de recambio bioquímico y grosor del tejido cortical. En la actualidad existen instrumentos para estimar con precisión el grado de calidad del hueso, como **histomorfometría** y la **imagen tridimensional** (microTC) aunque no se realizan como métodos de rutina.⁽⁷⁰⁾

La **histomorfometría**, es una técnica invasiva, no aplicable en clínica de forma sistemática, que valora parámetros estáticos y dinámicos y permite

cuantificar el volumen trabecular, el grado de mineralización, el grado de formación y el volumen de tejido osteoide entre otros. Se realiza una biopsia transilíaca de 8 mm de diámetro y 2 cm de largo⁽⁷¹⁾ previo marcaje con tetraciclinas. El tejido óseo se divide en dos fragmentos uno se coloca en alcohol del 70% para fijarlo y se destina al estudio histomorfométrico y el otro se utiliza para el estudio de metales y se coloca en un tubo de poliestireno.⁽⁷²⁾

El primero se procesa sin descalcificar y se realizan cortes de 3 a 5 micras. Los parámetros histomorfométricos se ordenan en cuatro categorías:

Parámetros estructurales: señalan tamaño y cantidad de hueso. Los principales son anchura de la biopsia, grosor de la cortical, área trabecular total del tejido analizado, porcentaje de hueso trabecular mineralizado en el área trabecular y grosor de las trabéculas.

Parámetros de resorción: indican la resorción ósea y son porcentaje de osteoclastos y de fibrosis peritrabecular y la erosión o melladura en el perímetro de las trabéculas óseas.

Parámetros estáticos de formación: muestran el porcentaje de osteoblastos y el grosor del osteoide localizados en el perímetro de las trabéculas óseas. Los más importantes son el grosor medio del osteoide en el perímetro trabecular, porcentaje del volumen de osteoide relacionado con el volumen óseo, porcentaje de osteoblastos en el volumen de las trabéculas vinculado con la superficie ósea y grosor de la pared ósea nueva.

Parámetros dinámicos de formación: Señalan la función celular ósea in vivo, y solo pueden evaluarse cuando el paciente recibe doble marcaje con tetraciclinas antes de tomar la biopsia. Los principales son la extensión de la superficie

perimetral trabecular cubierta por las marcas de tetraciclina (superficie mineralizada) y la distancia media entre las dos líneas de tetraciclina relacionada con el intervalo de tiempo entre ellas (velocidad de agregación del mineral). El tiempo de preparación del osteoide para ser mineralizado y la velocidad de formación ósea son parámetros derivados matemáticamente de las dos primeras medidas.

La **microtomografía computarizada** logra una imagen tridimensional de la microestructura ósea, proporcionando información sobre la conectividad de las trabéculas y permitiendo medir parámetros histomorfométricos estructurales como el volumen óseo o la superficie trabecular. El estudio *in vivo* permite una resolución más limitada (100 micras) que el estudio a partir de biopsias ya que podemos aumentar la radiación y por tanto la resolución consiguiendo imágenes de hasta una micra. Estas técnicas emplean sistemas microtomográficos con rayos X con una alta resolución. Una vez capturados los datos y realizada la reconstrucción tridimensional, el software calcula parámetros estructurales de la trabécula ósea tanto en dos dimensiones como en tres. Esta técnica tiene una alta correlación con la histomorfometría clásica, pero no debemos olvidar que solo nos da información estructural mientras que con la histomorfometría tenemos además información del tejido no mineralizado (osteoide) y de la actividad celular del hueso (osteoblastos/clastos).

Existen nuevos equipos que emplean radiación sincrotrón, radiación electromagnéticas producida por partículas cargadas que se mueven a alta velocidad en un campo magnético y pueden alcanzar resoluciones de hasta una micra. Permite el estudio de microroturas del hueso trabecular.

Con nanoTC se pueden obtener imágenes de 0,1 micras.

La **resonancia magnética** es una técnica de imagen que permite una reconstrucción de la microestructura ósea con una elevada resolución. Tiene capacidad de discriminar la transformación de las trabéculas y su disrupción. Es una técnica no invasiva que no irradia al paciente.⁽⁷¹⁾

Pruebas básicas

Además de las pruebas descritas y de la historia clínica, se realizan otras encaminadas a buscar posibles causas secundarias de la osteoporosis. Entre ellas hemograma y bioquímica completos. Para el diagnóstico de la osteoporosis, no existen pruebas de laboratorio específicas pero en los últimos 15 años, se ha desarrollado el estudio de múltiples marcadores biológicos del remodelado óseo, se están valorando diversos marcadores genéticos, análisis de orina y sangre buscando marcadores bioquímicos de la actividad de los osteoblastos u osteoclastos^(51,73) Unas pruebas bioquímicas miden la reabsorción (fosfatasa ácida, resistente al tartrato, cociente calcio/creatinina, piridinolina y deoxipiridinolina libres, hidroxiprolina, o los telopéptidos carboxi y aminoterminal del colágeno tipo I: el C-terminal (CTX) o el N-terminal (NTX), séricos u urinarios, y otras valoran la formación ósea (osteocalcina, fosfatasa alcalina o su isoenzima ósea y el propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I (PINP)).^(4,12) Estos marcadores son útiles en el seguimiento de los pacientes que se encuentran en tratamiento ya que nos da información de la efectividad terapéutica, ya que la DMO, solo se modifica en tiempos largos.^(70,73)

No obstante estos marcadores tienen limitaciones como el no reflejar la actividad de osteocitos o la aposición perióstica y no permite investigar la calidad del hueso y por tanto su fragilidad, por lo que se buscan otros marcadores

biológicos que se asocian al riesgo de fractura en mujeres postmenopáusicas o en hombres de edad avanzada, como esfingosina, esclerostina y FGF-23.⁽⁵¹⁾

Estudios más recientes demuestran un papel importante de MicroRNAs en la diferenciación y función de los osteoblastos y osteoclastos.^(74,75)

En líneas generales, el diagnóstico se relaciona con la combinación de datos obtenidos de la medición de la DMO mediante densitometría y de los obtenidos de las pruebas bioquímicas que valoran los marcadores bioquímicos de remodelado óseo.⁽⁷⁰⁾

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1994, establece una clasificación en función de criterios densitométricos que valoran la evolución de la masa ósea con la edad y la prevalencia e incidencia de las fracturas osteoporóticas en mujeres postmenopáusicas de raza blanca. Los valores de la DMO de los pacientes se comparan con la escala T que toma de referencia el pico máximo de masa ósea del joven. Se establecen cuatro grados: *(Tabla 5)*

1. **Normal:** cuando la densidad mineral ósea presenta un valor de una desviación estándar por debajo del valor del pico normal de masa ósea del joven.
2. **Osteopenia:** masa ósea entre 1 y 2,5 desviaciones estándar por debajo del pico de masa ósea normal del joven.
3. **Osteoporosis:** cuando la DMO presenta un valor inferior a 2,5 desviaciones estándar del pico de masa ósea del joven.
4. **Osteoporosis severa:** También llamada establecida cuando además del valor de densidad mineral ósea 2,5 desviaciones estándar por debajo se une la presencia de una o más fracturas tras traumatismos de bajo impacto.

A pesar de presentar limitaciones (no tiene en cuenta la calidad del hueso, de forma estricta solo es aplicable a mujeres postmenopáusicas de raza blanca, su aplicación principal es en columna lumbar y región femoral y pueden existir interferencias por patologías degenerativas o calcificaciones paravertebrales), esta clasificación está universalmente aceptada para el diagnóstico de la osteoporosis. Aunque según Sosa et al. 2009, sólo debería emplearse para conocer la epidemiología de la osteoporosis y no para determinar medidas preventivas o terapéuticas.⁽⁵⁶⁾

DIAGNÓSTICO DENSITOMÉTRICO	DMO valor T o T-score
Normal	T > -1
Osteopenia (baja masa ósea)	T < -1 y > -2,49
Osteoporosis	T < -2,5
Osteoporosis grave o establecida	T < -2,5 + fractura por fragilidad

Tabla 5 : Clasificación de la OMS 2004 (Tomado de Vargas et al. 2010)

En mujeres premenopáusicas y varones menores de 50 años se utiliza el Z-score⁽⁷⁶⁾ que recoge datos de sujetos normales de la misma edad y sexo. Se considera normal hasta dos desviaciones estándar por debajo. No define la osteoporosis pero alerta de una DMO disminuida para la edad del paciente.

La osteoporosis es una enfermedad que afecta a la calidad de vida de los pacientes, debido principalmente a la presencia de fracturas o a la preocupación por poder sufrir una. El trabajo de Sosa et al. en el 2010 recoge diversos estudios

en los que se demuestra un aumento de la mortalidad asociada a pacientes que han sufrido fracturas osteoporóticas.

1.3.2 Clasificación

I. Osteoporosis primarias

Son las más numerosas. Se incluyen en este grupo todos los pacientes en los que no se identifica ninguna otra enfermedad que justifique la osteoporosis. Dentro de este grupo encontramos:⁽⁵²⁾

a. Osteoporosis idiopática juvenil

Se presenta entre los 8 y los 14 años, con dolor óseo y fracturas con traumatismos leves. En muchos casos, se recuperan de forma espontánea en un plazo de 4 o 5 años.⁽⁵²⁾

b. Osteoporosis idiopática del adulto joven

Se presenta en mujeres pre-menopáusicas y varones jóvenes sin acompañarse de factor etiológico alguno. A veces se relaciona con un embarazo, presentando una DMO del hueso trabecular baja que se mantiene durante años. No responden al tratamiento con estrógenos. La evolución depende de cada paciente y no suele acompañarse de deterioro progresivo, aunque sí fracturas recidivantes.⁽⁵²⁾

c. Osteoporosis post-menopáusica. Tipo I

Se da entre los 51-75 años, con pérdida acelerada y desproporcionada de hueso trabecular, lo que implica una alta remodelación ósea. Son frecuentes las fracturas del radio y vertebrales. Se acompaña de disminución de la actividad de la PTH

para compensar el aumento de la reabsorción ósea. El tratamiento antirresortivo es eficaz para frenar la pérdida ósea.⁽⁵²⁾

d. Osteoporosis senil. Tipo II

Se relaciona con bajo remodelado óseo con disminución de la función de los osteoblastos, pacientes sedentarios o que están inmovilizados, problemas de absorción del calcio, déficit de vitamina D e hiperparatiroidismo secundario. Se presenta en varones y mujeres por encima de los 70 años y se acompañan de fracturas de cuello femoral porción proximal del húmero y pelvis ya que está afectado el hueso trabecular y el cortical. El tratamiento antirresortivo no es muy eficaz.⁽⁵²⁾

II. Osteoporosis secundarias

Incluye todas las osteoporosis que aparecen como consecuencia de otras enfermedades o de su tratamiento, como por ejemplo las derivadas del uso de glucocorticoides.^(52, 77)

1.3.3 Fisiopatología

El hueso es un tejido en constante remodelación y gracias a ello se sustituye el hueso viejo por otro joven disminuyendo el riesgo de fracturas y se controla la homeostasis del calcio, del fósforo y del magnesio. En la osteoporosis se produce un desequilibrio entre los procesos de reabsorción y formación ósea a favor de la reabsorción, **(balance negativo)** que comienza a los 40 años aproximadamente y además hay un aumento del número de unidades de remodelación que origina un aumento del recambio óseo.⁽⁵³⁾ Dependiendo de la masa ósea inicial, de la cantidad de balance negativo y la edad del paciente tendremos una mayor o menor pérdida de masa ósea llegando o no a valores compatibles con la osteoporosis. El

predominio de la reabsorción se relaciona con una disminución del número y función de los osteoblastos debido a la edad así como una aumento de la actividad de osteoclastos en algunos casos.

El aumento del número de unidades de remodelación en balance negativo implica un aumento del número de zonas del esqueleto con pérdida de masa ósea. Estos procesos donde predomina el recambio óseo se denominan **osteoporosis de recambio alto**, como la postmenopáusicas. o debidas a hiperparatiroidismo secundario que puede estar condicionado por disminución de niveles séricos de Vitamina D o disminución de la función renal.

Existen muchos marcadores o **factores de riesgo**⁽⁵²⁾ de osteoporosis. El más importante de ellos es el paso de más de 10 años de menopausia, ya que el déficit de estrógenos implica una falta de control de los osteoclastos dando un aumento de remodelado óseo a favor de la reabsorción. El riesgo es mayor cuanto más precoz es la menopausia y si es una menopausia quirúrgica, que provoca un déficit hormonal brusco.

Otro factor importante es la edad siendo más específico en hombres ya que en mujeres se relaciona con la menopausia. Por encima de los 75 años la proporción entre hombres y mujeres pasa de 8:1 de edades jóvenes a 2:1, a favor de las mujeres. A medida que aumenta la edad se unen varios condicionantes, menor absorción de calcio, carencia de Vitamina D, sedentarismo entre otros, que afectan al remodelado óseo.

La raza también es un factor a tener en cuenta ya que la DMO es menor en la raza blanca y asiática que en la negra⁽⁷⁶⁾

El índice de masa corporal inferior a 20 Kg/m² es un factor de riesgo, así como alteraciones del estado nutricional, antecedentes personales y/o familiares

de fracturas por traumatismos leves y determinadas enfermedades como la diabetes tipo I, trasplante de órganos o determinados tratamientos farmacológicos.⁽⁷⁶⁾

La osteoporosis es una enfermedad con componente genético, se da con más frecuencia en hijas de pacientes osteoporóticas. Estudios recientes demuestran la existencia de marcadores genéticos de riesgo de padecer osteoporosis, así mismo la carga genética marca el pico máximo de masa ósea alcanzado en la juventud. Así mismo son factores de riesgo el hipogonadismo y enfermedades endocrinas, reumatológicas, nutricionales, digestivas o neoplásicas.⁽⁵⁶⁾

Existen otros factores que pueden influir en el desarrollo de la enfermedad y que son modificables^(52,56). Dentro de ellos están el estilo de vida, incluyendo la dieta, actividad física, ingesta de calcio que debe rondar los 1000-1200 mg/día, de Vitamina D que debe ser entre 400-800 U.I. diarias. Las dietas hiperproteicas y las vegetarianas se asocian a osteopenia⁽⁵⁶⁾.

Otros factores modificables a tener en cuenta son los hábitos tóxicos. El tabaquismo disminuye la actividad osteoblástica y la absorción de calcio en el intestino, además tiene un efecto antiestrogénico, dando lugar a una menor DMO y mayor incidencia de fractura vertebral y de cadera. También el consumo de alcohol de forma crónica disminuye la actividad de los osteoblastos, y altera el metabolismo del calcio, fósforo, magnesio y de la vitamina D.

La tabla siguiente resume estos factores de riesgo. *(Tabla 6)*

No modificables	Modificables
Edad	Sedentarismo
Sexo	Escasa ingestión de calcio
Genética	Dieta hiperproteica
Menopausia	Tabaco
Hipogonadismo	Abuso de alcohol y/o café
Enf. Endocrinas: Cushing, hiperparatiroidismo primario, hipertiroidismo	Delgadez
Artritis reumatoide	Corticoides
Malnutrición, anorexia	Inmunosupresores
Celiaquía, hepatopatías graves	Anticoagulantes
Mieloma múltiple	Heparina

Tabla 6 : Factores de riesgo para masa ósea baja. (Tomado de Sosa et al. 2009)

Se deben diferenciar los factores de riesgo relacionados con la DMO baja y los asociados a fracturas. La National Osteoporosis Foundation determina cinco factores de riesgo para fracturas que son la DMO, la historia previa personal o familiar de fracturas, la delgadez y el tabaquismo. La herramienta propuesta por la OMS para evaluar el riesgo de fractura es el FRAX, permite detectar grupos de alto riesgo y ayuda a decidir cuándo tratar pero tiene limitaciones.⁽⁷⁶⁾

El FRAX calcula la probabilidad a diez años para cualquiera de las cuatro fracturas osteoporóticas, vertebral clínica, cadera, muñeca y húmero proximal, empleando para ello, factores de riesgo y tasa de fracturas y mortalidad específicas del país.

1.3.4 Epidemiología

Dentro de las enfermedades metabólicas la osteoporosis se considera de las más frecuentes, aunque su prevalencia es difícil de determinar ya que si no aparecen complicaciones la enfermedad se mantiene asintomática y puede pasar desapercibida. Se usan las fracturas osteoporóticas, especialmente las vertebrales, como marcador indirecto de prevalencia.⁽⁵²⁾

En España se estima que hay 3,5 millones de enfermos de osteoporosis y se producen 100.000 fracturas osteoporóticas. Se habla de 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 12 hombres mayores de 50 años.⁽⁵²⁾

La enfermedad presenta según la Organización Mundial de la Salud, una prevalencia en caucásicos mayores de 50 años del 8% en varones y del 30% en mujeres. Este dato aumenta hasta el 50% en mujeres mayores de 70 años. Presentando las mujeres una mayor incidencia de fracturas, especialmente trabeculares. La prevalencia de fracturas por encima de 50 años es del 16% en mujeres y del 12% en hombres. En los 4-8 años siguientes a la menopausia se producen las fracturas vertebrales y de radio y a partir de los 70-75 años las de cadera esta última afecta al 5% de las mujeres mayores de 65 años.

Las de radio se producen por caídas con la mano en extensión y su incidencia aumenta con la edad en mujeres y se mantiene en hombres con una relación 4:1.

La diferencia por sexo se atribuye a la mayor masa ósea básica del varón, a su menor esperanza de vida y a que los hombres tienen menor tendencia a caerse. En España un tercio de los mayores de 65 años se cae por lo menos una vez al año y las mujeres se caen el doble que los hombres.

1.3.5 Tratamiento

Dentro del tratamiento se distingue la terapia farmacológica y las medidas no farmacológicas.

En la actualidad, se dispone de una amplia variedad de fármacos para el tratamiento de la osteoporosis, que se pueden englobar en dos grupos, por un lado terapias encaminadas a aumentar la formación ósea, **terapias osteoformadoras o anabólicas** y por otro los tratamientos que intentan disminuir la reabsorción, son las **terapias antirresortivas**, que disminuyen la acción de osteoclastos, decrecen el recambio óseo, permite la acumulación de minerales en la matriz ósea, incrementan la densidad ósea y bloquean la apoptosis en los osteoblastos, así de forma indirecta van a estimular la formación de nuevo hueso.

Además de los fármacos se deben tomar medidas generales como una ingesta adecuada de calcio y vitamina D, un estilo de vida saludable que incluya ejercicio físico, evitar el consumo de alcohol y tabaco y medidas encaminadas a reducir las caídas.

El objetivo fundamental del tratamiento es reducir el riesgo de fractura. Los pacientes con un mayor riesgo de fractura son los que más se pueden beneficiar de estas terapias.⁽⁷⁶⁾

Para el éxito del tratamiento es fundamental asegurar un correcto aporte de calcio y vitamina D para lo que se recomienda el uso de suplementos en casos en que la ingesta dietética no sea suficiente.

A. Terapias osteoformadoras o anabólicas:

Los agentes anabólicos pueden incrementar el número de precursores de osteoblastos así como su diferenciación a osteoblasto maduro y su función permitiendo una ganancia de tejido óseo.⁽⁷⁷⁾ Entre las terapias osteoformadoras se encuentran:

Teriparatida

Es un fragmento activo (aminoácidos 1-34) de la parathormona humana.⁽⁷⁸⁾ obtenida por tecnología genética (DNA recombinante). Tiene efecto osteoformador, tanto cortical como trabecular, además, mejora la calidad del hueso, incrementando indirectamente la actividad osteoblástica y reconstituyendo la microarquitectura correcta.⁽⁷⁰⁾ y se administra a dosis de 20µg al día en inyección subcutánea.⁽⁷⁹⁾ Se considera el único agente capaz de incrementar la DMO mediante formación de hueso nuevo.^(80,79) Está indicada en osteoporosis postmenopáusica, en la asociada a glucocorticoides y en pacientes con alto riesgo de fractura. Reduce la incidencia de fracturas vertebrales y no vertebrales pero no se ha demostrado su utilidad en las de cadera. Como efectos adversos se producen calambres e hipercalcemia. No se prolonga el tratamiento más de dos años por aparición, en ratas, de osteosarcoma. ⁽⁷²⁾

No todos los pacientes obtienen los mismos beneficios con el uso de este fármaco, parece que la respuesta está influenciada por diversos factores de manera que habrá mayor incremento de DMO si se presenta una alta concentración basal de péptido procógeno tipo I N-terminal (PINP), si el paciente es más joven, y parte de una baja densidad mineral ósea. Por otro lado, algunos autores afirman

que tratamientos previos con fármacos antirresortivos como los bifosfonatos, especialmente alendronato, potencian la eficacia de teriparatida⁽⁷⁶⁾ con efectos muy positivos en el incremento de la DMO y marcadores de formación ósea independientemente de haber sido sometidos los pacientes a tratamientos antirresortivos previos.⁽⁸⁰⁾

También se utiliza la PTH 1-84 que disminuye las fracturas vertebrales pero no otro tipo de fracturas.⁽⁷⁶⁾ Esta presentación solo está disponible en Europa, se han descrito altas incidencias de hipercalcemia e hipercalcemia.

El tratamiento con teriparatida se considera una segunda opción, sobre todo en Europa y no se puede administrar a menos que los pacientes hayan tenido un tratamiento previo con antirresortivos sin resultados óptimos o hayan sufrido fracturas osteoporóticas. Esta restricción se debe a que es un tratamiento caro que se tiene que administrar vía subcutánea diariamente. La duración recomendada del tratamiento es de 2 años en Estados Unidos y de 18 meses en Europa ya que su eficacia y seguridad no está demostrada con estudios clínicos por encima de dos años de tratamiento.⁽⁷⁷⁾

Entre los efectos adversos se puede producir una leve hipercalcemia.

B. Terapias antirresortivas

1. Bifosfonatos

Su efecto se basa en la disminución del remodelado óseo con una acción predominante sobre la reabsorción.

Son la primera elección en el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica.

Son análogos del pirofosfato. Se administran vía oral, en ayunas y con abundante agua.

Entre las contraindicaciones se encuentran alteraciones esofágicas, patologías del tracto gastrointestinal⁽⁷⁶⁾ alto e incapacidad de permanecer erguido tras su administración, insuficiencia renal grave e hipocalcemia.

La duración del tratamiento no debe ser inferior a 5 años, tras este tiempo se valorará la situación de cada paciente para decidir como continuar su terapia.

Entre los bifosfonatos se distinguen:

Alendronato

Es un aminobifosfonato que se administra vía oral (10 mg diarios o 70 mg semanales). Aumenta la masa ósea, reduce los marcadores de remodelado y reduce el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales.⁽⁷⁶⁾ La preparación semanal lleva asociada vitamina D.

Risedronato

Aminobifosfonato administrado vía oral (5 mg diarios, 35 mg semanales y 75 mg dos días consecutivos al mes). Disminuye el riesgo de fracturas vertebrales y de cadera en mujeres postmenopáusicas. También disminuye los niveles de marcadores de remodelado⁽⁷⁶⁾ y es útil en osteoporosis inducida por glucocorticoides y en la osteoporosis del varón.

Ibandronato

Aminofosfonato disponible en dosis orales mensuales de 150 mg e intravenosas trimestrales de 3 mg.

Eficaz en la prevención de fracturas vertebrales en mujeres postmenopáusicas con o sin fractura previa, para las no vertebrales en pacientes

de alto riesgo, aunque no se ha demostrado su eficacia en fracturas de cuello femoral. ⁽⁷²⁾

Zoledronato

Se administra vía intravenosa, 5mg anuales. Eficaz en prevención de fracturas vertebrales, no vertebrales y de cadera. Se utiliza en mujeres postmenopáusicas, hombres con alto riesgo de fracturas, osteoporosis por glucocorticoides. Se relaciona con disminución de la mortalidad de pacientes con fracturas de cadera. Es una alternativa para pacientes que no toleran la administración oral. ⁽⁷²⁾

2. Tratamiento hormonal sustitutivo

El tratamiento con estrógenos ha demostrado una disminución de fracturas vertebrales y no vertebrales, sin embargo actualmente no se descarta que produzca un incremento del riesgo de cáncer de mama, de infarto agudo de miocardio, de trombo-embolismo venoso y de infarto cerebral isquémico. Por todo ello, hoy día es un tratamiento de última elección para casos en que no se pueda realizar otra opción terapéutica o para pacientes con menopausia precoz. ⁽⁷²⁾

3. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERM)

Actúan como agonistas en el hueso y antagonistas en el útero y mama, del receptor estrogénico. Disminuyen la reabsorción ósea, reducen los marcadores bioquímicos del recambio óseo a niveles premenopáusicos y aumentan la densidad mineral ósea.

Con su uso se obtiene efectos beneficiosos de los estrógenos en el hueso y se evitan los efectos negativos en útero y mama.

Entre ellos se encuentran:

Raloxifeno

Se administra vía oral 60 mg al día. Disminuye riesgo de fracturas vertebrales en mujeres con osteopenia y con osteoporosis pero no se ha demostrado su eficacia en la prevención de las no vertebrales y de cadera. Su uso prolongado disminuye la incidencia de cáncer de mama, disminuye niveles de colesterol total y LDL pero no el riesgo cardiovascular.

El efecto secundario más frecuente son los sofocos. Favorece la aparición de trombosis venosa profunda por lo que las pacientes que lo usan deben evitar el tabaco y las inmovilizaciones prolongadas.

Bazedoxifeno

Administración oral 20 mg al día. indicado para osteoporosis postmenopáusicas reduciendo las fracturas vertebrales. No se ha demostrado su utilidad para prevenir las de cadera. Los efectos secundarios son sofocos y calambres. Al igual que el anterior no se debe usar en pacientes con riesgo de trombosis venosas.

4. Calcitonina

Actualmente no se utiliza como tratamiento para la osteoporosis. No tiene efecto preventivo de fracturas no vertebrales y está discutida la prevención de las vertebrales.

5. Denosumab

Es un anticuerpo monoclonal contra el RANKL. Disminuye el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales incluida la cadera y se toma cada seis meses en dosis de 60 mg. Se une al ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL) impidiendo su unión al receptor (RANK) inhibiendo la osteoclastogénesis. Está indicado en osteoporosis postmenopáusicas, en la del hombre con cáncer de próstata o con alto riesgo de fracturas. Como contraindicación está la hipocalcemia.

C. Acción dual

Ranelato de Estroncio

Se toma vía oral, 2 g en ayunas, tiene un doble efecto, antirresortivo y osteoformador y disminuye el riesgo de fracturas vertebrales no vertebrales y de cadera. Su uso está restringido por diversas alertas médicas.

En líneas generales, todas las guías proponen los bifosfonatos orales como primera opción de tratamiento, dentro de ellos el alendronato y risedronato.

El denosumab subcutáneo cada seis meses es cómodo, seguro y eficaz para pacientes polimedicados, poco colaboradores o con problemas digestivos o renales.

La teriparatida está reservada a pacientes con muy baja DMO, o que han sufrido una o más fracturas vertebrales previas, sin tratamiento o con más de un año con antirresortivos ya que es un fármaco caro y que tiene que administrarse vía subcutánea diariamente. Además no tiene efecto en frente a las fracturas de cadera. El tratamiento se prolongará 2 años y se continuará con un antirresortivo.

Los SERM están indicados en pacientes postmenopáusicas menores de 65 años con riesgo moderado o pérdida acelerada de DMO y necesidad de reducir riesgo de cáncer de mama.

D. Otras terapias

Además de los fármacos descritos, se buscan terapias alternativas para evitar los efectos adversos de los tratamientos tradicionales. Entre ellas destacan:

Isoflavonas de soja

El consumo diario de productos lácteos enriquecidos con isoflavonas de soja puede ser una opción como medida preventiva de los efectos óseos de la menopausia. Ya que aumenta los niveles de 25-OH-vitamina D y desciende los marcadores del metabolismo óseo.⁽⁸¹⁾

Flúor

El ión flúor administrado como fluoruro de sodio o como monofluorofosfato sódico, actúa como amplificador de señales anabólicas a nivel de los osteoblastos y puede inducir aumento de la masa ósea trabecular. Dado que no se ha demostrado su efecto sobre la densidad mineral de la cadera, no se debería administrar a pacientes con fracturas de cadera previas o disminución marcada de la DMO femoral. Tampoco está indicado en ancianos. No ha habido demostración de su efecto antifractura.⁽⁷³⁾

IGF-I

Como ya se ha descrito en el apartado de factores de crecimiento, el IGF-I se ha probado como tratamiento de osteoporosis en ratas, en las que se demuestra

incremento en la formación ósea y reducción de la diferenciación de osteoclastos por disminución de RANKL.⁽⁴³⁾

Además, un estudio realizado en ratones demuestra que el IGF-I combinado con alendronato en el tratamiento de la osteoporosis incrementa la densidad mineral ósea total y la femoral en mayor medida que usando el IGF-I solo.⁽³⁷⁾ Sin embargo, no ocurre lo mismo si se compara la combinación de fármacos con el alendronato solo.

No obstante, la seguridad y los posibles efectos adversos de su utilización durante largos periodos de tiempo, el coste del tratamiento y la vía de administración (vía parenteral) limitan su uso.

Reguladores moleculares

En la actualidad el estudio de reguladores moleculares con efecto anabólico permite probar nuevas terapias, como son los anticuerpos monoclonales contra la esclerostina y contra DKK-1, que son dos proteínas que se oponen a la vía de señalización Wnt/ β -catenina que favorece la formación ósea, estimulando la replicación y diferenciación de preosteoblastos e inhibiendo la apoptosis de osteoblastos y osteocitos.

Asimismo, se está utilizando la Proteína Morfogenética Ósea 2 (INFUSE®), con propiedades osteogénicas, aumentando la resistencia ósea en zonas de fracturas, acelerando su consolidación.

En la siguiente tabla se recogen los grupos de pacientes susceptibles de recibir tratamiento activo para la osteoporosis. No obstante son recomendaciones que hay que individualizar según cada paciente. *(Tabla7)*

Grupos de pacientes susceptibles de tratamiento frente a la osteoporosis	
➤	Pacientes con fractura por traumatismo de bajo impacto independientemente de su edad, factores de riesgo y valores de DMO.
➤	Mujeres con menopausia precoz, con cifras en rango de osteopenia en la DEXA y presencia de al menos otro factor de riesgo mayor de fractura.
➤	Pacientes con osteopenia (T-score entre -1 y -2,5) y con al menos dos factores de riesgo mayor de fractura.
➤	Pacientes que presentan una DMO de columna y/o cadera con una T-score < de -2,5.
➤	Pacientes en tratamiento con glucocorticoides en dosis ≥ 5 mg de prednisona al día, o dosis equivalentes de otros corticoides, durante al menos 3 meses, independientemente de su DMO.
➤	Pacientes que presenten al menos dos factores mayores de riesgo de fractura, independientemente de su masa ósea (imposibilidad de realizar DXA).
➤	Pacientes que presentan un riesgo calculado con FRAX de fractura mayor osteoporótica $\geq 10\%$ o de cadera $\geq 3\%$.

Tabla 7 : Grupos de pacientes susceptibles de recibir tratamiento

1.4 MODELO EXPERIMENTAL

1.4 Modelo experimental

Seleccionar un modelo animal de experimentación adecuado es una tarea difícil. Es necesario valorar una gran variedad de factores en función del trabajo que se vaya a desarrollar como si el animal es apropiado como análogo, si la información que obtengamos es extrapolable al hombre, la uniformidad genética de los organismos, las propiedades biológicas, la posibilidad de generalizar los resultados, coste y la disponibilidad de los animales, así como su manejo y condiciones de estabulación durante el experimento y finalmente las implicaciones éticas y sociales del empleo de los animales.⁽⁸²⁾

A la hora de elegir un modelo animal para el desarrollo de un estudio sobre metabolismo óseo, como es el caso de la osteoporosis, hay que tener en cuenta las características bioquímicas y microestructurales del tejido óseo de la especie animal seleccionada, así como las características macroscópicas como la distribución del hueso cortical y medular. Valorar a qué edad se produce el pico de masa ósea, si a medida que aumenta la edad se incrementa la pérdida ósea, si se relaciona con los estrógenos, si se presentan fracturas espontáneas, si la magnitud o el desarrollo del proceso es similar a la situación en humanos, como responde a la ovariectomía, entre otras cuestiones.⁽⁸²⁾

El modelo animal debe poder imitar la situación clínica que se trate en cada caso. La elección del modelo debe basarse en criterios científicos, éticos y prácticos y reflejar la biología humana o la enfermedad y adaptarse a un entorno clínico adecuado para el producto que está siendo probado.⁽⁸³⁾

Todo esto da una idea de lo complicado de la selección de un modelo apropiado.

Los modelos mejor entendidos y descritos en la literatura, tienen comprobada su predictibilidad en los resultados clínicos. Las especies animales utilizadas con mayor frecuencia como animales de experimentación en los estudios sobre fisiología ósea y valoración de la eficacia y seguridad de determinados fármacos son las ratas, los conejos y ratones, suponiendo un 80% del total de los animales usados para estudios sobre reparación ósea. El 20% restante se reparte entre ovejas, cabras, cerdos, perros y monos.⁽⁸³⁾ Desde 1994 la Food and Drug Administration (FDA) americana, requiere datos de estudios en ratas y en un modelo animal grande para la evaluación preclínica de nuevos fármacos a dosis clínicas y a dosis 5 veces superior.⁽⁸²⁾ Además de estudiar nuevas terapias, en los avances del tratamiento de la osteoporosis juegan un papel importante el diseño de dispositivos protéticos solos o acompañados de recubrimientos biológicos que favorezcan la osteointegración en las condiciones del hueso osteoporótico. Gracias a la utilización de modelos animales, las características biológicas y biomecánicas del implante, de injertos con o sin proteínas morfogenéticas óseas, pueden ser estudiadas durante largos periodos de tiempo y en gran número de casos, permitiendo un control experimental imposible de realizar en estudios clínicos en humanos.⁽⁸²⁾

Monos, perros y ratas se utilizan en estudios de seguridad preclínicos y los biomarcadores séricos del metabolismo óseo están establecidos y validados. No obstante la utilización de monos y perros está restringido y se usan solo si son necesarios para las últimas fases de pruebas de eficacia y seguridad.⁽⁸³⁾

Además hay otros factores a tener en cuenta a la hora de seleccionar la especie animal para la investigación, como el tamaño del animal, el coste tanto de su adquisición como de su mantenimiento, disponibilidad, criterios éticos, su tolerancia a las condiciones del cautiverio, los ciclos de cría, facilidad de manejo, entre otros.⁽⁸³⁾

Ningún modelo animal imita totalmente las condiciones humanas ya que no presentan propiedades esqueléticas o biomecánicas idénticas a las humanas.⁽⁸³⁾

A pesar de que todos los organismos tienen algunas diferencias en la fisiología ósea parece que el conejo es especialmente útil como modelo experimental aplicable a humanos.

Con el fin de reproducir a nivel experimental un modelo osteoporótico postmenopáusico se han empleado diversas especies animales a las que se priva de función ovárica mediante una ovariectomía, obteniendo así alteraciones óseas similares a las que aparecen en la patología humana. De este modo se pueden realizar mediciones y estudios útiles para el diagnóstico y tratamiento de la pérdida ósea postmenopáusica, así como de las fracturas osteoporóticas, ya que se reproducen las características clínicas similares a las de las mujeres postmenopáusicas.⁽⁸³⁾

Los animales utilizados en experimentación se pueden dividir en dos grupos:⁽⁸⁴⁾

Animales pequeños: se incluyen ratas, ratones, cerdos guineanos y conejos. Se necesita la aprobación de un comité ético local.

Animales grandes: incluye perros, cabras y primates. Requieren la aprobación de un comité ético central además del local.

Monos

La estructura ósea, composición, patrón de remodelado son similares a los humanos. Los datos obtenidos en los estudios sobre ellos muestran grandes similitudes entre los monos y los humanos en cuanto a la respuesta del hueso ante el cese de la función ovárica. Se consideran animales menopaúsicos por encima de los 20 años de edad, siendo la osteoporosis postmenopáusica dependiente de las hormonas de manera similar a lo que ocurre en humanos.⁽⁸²⁾ En la mayoría de las investigaciones se emplean animales más jóvenes ovariectomizados, al tener el esqueleto inmaduro no es un modelo del todo equiparable a la osteoporosis postmenopáusica.⁽⁸²⁾

Su uso es controvertido por problemas éticos y técnicos incluido el alto coste y disponibilidad limitada, especialmente en caso de animales de edad avanzada.^(84,82) Por ello solo se utilizan en casos estrictamente necesarios, cuando la investigación en otros animales no aporte respuestas, o como paso previo a los ensayos en humanos.

Los monos titís se han propuesto recientemente para el estudio del esqueleto. Comparado con los macacos, los titís tienen una pubertad temprana con rápida maduración sexual que les lleva a alcanzar pronto el pico de masa ósea. Además son fáciles de criar y de manejar en cautividad.⁽⁸⁴⁾

Perros

Estos animales han sido ampliamente utilizados durante muchos años. Son menos costosos que los monos, más fáciles de manejar. La composición ósea y el remodelado en perros es similar a la de los humanos, aunque la pérdida ósea tras el cese de la función ovárica es insignificante, y no se relaciona con la aparición de fracturas, por lo que su utilidad como modelo de estudio de los cambios óseos postmenopáusicos es limitada. Además la ovulación en estos animales es cada seis meses.⁽⁸²⁾

Sin embargo si son muy útiles para el estudio de aspectos generales del esqueleto humano y para el estudio de fármacos porque los procesos de absorción son más parecidos a los del hombre que en otros animales como por ejemplo, las ovejas.⁽⁸²⁾

Los perros se utilizan en estudios de seguridad como segunda especie.^(58,64) Los biomarcadores del metabolismo óseo están validados y establecidos para perros. Son los más utilizados en estudios periodontales, especialmente en estudios de regeneración de tejidos⁽⁸⁴⁾ Sin embargo, existe una preocupación en la sociedad respecto al uso de perros como animales de experimentación por lo que se restringe su utilización.⁽⁸³⁾

Gatos

Los gatos en crecimiento pueden ser útiles para el estudio de la osteoporosis porque se le puede inducir osteopenia mediante inmovilización, con dieta baja en calcio, o alta en fósforo. Además son fáciles de manejar y de mantener en cautividad.⁽⁸²⁾ Sin embargo la mayoría de gatas domésticas están

ovariectomizadas sin asociarse esto a presencia de fracturas espontáneas, ni existe relación entre la edad y la pérdida de hueso, por lo que algunos autores dudan de su aplicación como modelo osteoporótico.⁽⁸²⁾

Además, su uso al igual que el del perro, plantea problemas de aceptación social.^(83,82)

Cerdos

Con los avances en la cría de minicerdos y microcerdos se ha incrementado su uso como animales de experimentación, ya que se ha eliminado el problema del tamaño elevado del animal. Los minicerdos adultos pesan alrededor de 60 kilos mientras que un cerdo de granja puede pesar más de 150 kilos.⁽⁸²⁾ La anatomía ósea, microestructura, remodelado, el ciclo reproductivo y curación es parecida a la humana. Es también conocido que su metabolismo hepático y la función gastrointestinal son muy parecidos al humano. Modelos osteoporóticos mediante ovariectomía y dieta baja en calcio (0,75%), han demostrado ser útiles en la investigación ósea.^(83,82)

Ovejas

Las ovejas se presentan como un modelo animal prometedor para el estudio de la osteoporosis por varias razones: son dóciles, fáciles de manejar y mantener en cautividad, son relativamente baratas, disponible en gran número, ovulan de forma espontánea y el tamaño de sus huesos es grande por lo que permite evaluar implantes ortopédicos.⁽⁸²⁾ La respuesta ósea al paso del tiempo o a la ovariectomía es muy parecida a la humana. El periodo de maduración esquelética es muy largo y la microestructura es diferente a la de los humanos, además presentan variaciones

estacionales de la masa ósea, la respuesta a la ovariectomía se manifiesta tras 12-24 meses. Por otra parte, las características y funcionamiento del aparato digestivo son muy diferentes por lo que para el estudio de absorción de fármacos no es un modelo útil.

Conejillos de indias. (Cobayas)

Son mamíferos de investigación muy utilizados debido a que su ciclo reproductivo es similar al humano. Por su pequeño tamaño el alojamiento es más fácil y son más económicos que otros animales. Pero debido a que el déficit de estrógenos en estos animales, no implica cambios en la masa ósea, no es útil para reproducir un modelo de osteoporosis humana.⁽⁸²⁾

Roedores

El animal más empleado como modelo de experimentación ha sido la rata.^(85,86,87) Las características esqueléticas y la biología ósea de los roedores son las menos parecidas a las de las humanas. Sin embargo los estudios en roedores son muy útiles por la información que nos dan de una manera rentable.⁽⁸³⁾ Por otro lado, las ratas ovariectomizadas muestran la mayoría de las características de la osteoporosis postmenopáusica.⁽⁸²⁾

La genética de los ratones es bien conocida, siendo muy adecuados para estudiar con cepas genéticamente modificadas los mecanismos moleculares de la fisiología y patología ósea. Las ratas son los animales más usados para estudios toxicológicos y para estudiar las propiedades fármaco-dinámicas y fármaco-cinéticas de tratamientos nuevos. Los receptores de las células óseas de las ratas son similares a los de los humanos y se comportan de la misma forma. Por otro

lado el hecho de que en roedores no cese el crecimiento y la falta de sistemas de Havers es un inconveniente para estudios destinados a esqueletos adultos.⁽⁸³⁾

Hurón

Presenta sistema haversiano y tras ovariectomía se aprecia una pérdida ósea en la tibia proximal. Es un modelo relativamente nuevo para el estudio de la osteoporosis postmenopáusica. Se ha utilizado para valorar los efectos de la hormona paratiroidea (PTH), siendo demasiado pequeño para el estudio del anclaje de implantes en hueso osteopénico.⁽⁸²⁾

Conejos

Los conejos son los animales más pequeños, a excepción de los roedores, utilizados en los estudios de investigación músculo-esqueléticos, a pesar de que la macro y microestructura ósea del animal es diferente a la humana.

Dentro de los conejos, la raza más empleada es la Nueva Zelanda blanco que presenta menor agresividad y por presentar menos problemas de salud que otras especies.⁽⁸⁴⁾ Nuestro trabajo se desarrolla sobre conejos que a diferencia de otros animales consiguen su maduración esquelética muy poco tiempo después de completar su desarrollo sexual, aproximadamente a los seis meses, presentan un turnover alto, produciéndose todos estos cambios en un período muy corto de tiempo, facilitando la obtención de datos en meses en lugar de en años.^(59,88)

Su crecimiento termina entre las 24 y 32 semanas de edad, alcanzando una verdadera maduración esquelética que coincide con el cierre de las epífisis. Además este cierre se asocia, al igual que en los humanos, con un aumento en las concentraciones de estrógenos. Aunque el cese del crecimiento se produce

aproximadamente a las 28 semanas de edad, la densidad mineral ósea continúa incrementándose hasta la semana 36. Esto último también es comparable a lo que ocurre en humanos, en los que se alcanza el pico de masa ósea después de la maduración esquelética. Por otro lado tanto los conejos como los humanos presentan altos niveles de marcadores de turnover óseo así como de 1,25 dihidroxi-vitamina D durante la fase de crecimiento.⁽⁸⁸⁾

Estas similitudes unidas a la disponibilidad y la adaptación a la manipulación experimental de estos animales hacen de los conejos un modelo animal de estudio adecuado. Por su tamaño reducido, no se pueden utilizar para valorar prótesis ortopédicas pero sí para el estudio de implantes dentales en tibia, fémur o mandíbula.⁽⁸²⁾

2. JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento de la esperanza de vida, cada vez con mayor frecuencia, se encuentran pacientes de edad avanzada y hay que enfrentarse a la necesidad de reponer dientes perdidos, para así, restablecer tanto la función como la estética de estos pacientes, permitiéndoles mantener una calidad de vida adecuada. Para ello, se emplean diversas técnicas protéticas fijas, removibles y entre ellas destaca, por su capacidad para emular los dientes naturales, la rehabilitación de los espacios desdentados mediante la colocación de implantes dentales osteointegrados (IOI).

La utilización de implantes dentarios para sustituir los dientes ausentes, actualmente es una técnica ampliamente extendida y aceptada gracias a su elevada fiabilidad, que va en aumento debido a los avances en investigación al respecto, que favorecen el desarrollo de distintos diseños de implantes, tamaños, morfología, distintos recubrimientos en las superficies de los mismos, aplicación local o sistémica de factores de crecimiento, que persiguen favorecer la osteointegración, que es el proceso biológico responsable de la fijación del IOI al hueso de una manera estable, duradera y fiable.

El porcentaje de éxito de los IOI en estos momentos varía de un 95% a un 98% dependiendo de que se trate de hueso maxilar o mandibular más compacto y con mayor densidad. No obstante, como se ha comentado anteriormente, el aumento de pacientes de edad avanzada implica la presencia de situaciones más críticas en cuanto a cantidad y calidad del hueso presente para la colocación de nuestros implantes, favoreciendo una disminución del porcentaje de éxito,

poniendo en duda la fiabilidad del mismo. El hueso alveolar, en el que se alojan los dientes se reabsorbe tras la pérdida de los mismos y perdemos hueso tanto en altura como en anchura, especialmente durante el primer año. Esta pérdida es mayor cuanto más tiempo pasa desde la ausencia dentaria, además estos pacientes tienen disminuida su capacidad reparadora y suelen presentar enfermedades sistémicas y/o tratamientos farmacológicos que alteran el metabolismo óseo y por tanto el proceso de osteointegración de los implantes dentarios.

Una de las patologías que puede comprometer el éxito de los IOI y que es muy frecuente en la población de edad avanzada, especialmente en el género femenino, es la osteoporosis. Este proceso se relaciona clásicamente, con una pérdida de masa ósea, con disminución tanto del número como del tamaño de trabéculas, además de un menor espesor de las corticales. Más recientemente, se habla de riesgo de fracturas patológicas,⁽⁴⁹⁾ y a la alteración tanto de la cantidad como de la calidad del hueso.⁽⁵³⁾

Este trabajo se desarrolla en un modelo de experimentación animal (conejas), con osteoporosis inducida mediante ovariectomía y dieta hipocálcica,⁽⁵⁹⁾ tratando con ello, de reproducir condiciones similares a las que se presentan en los pacientes comprometidos desde el punto de vista de su capacidad de regeneración ósea tras la colocación de implantes. En la literatura se ha utilizado con frecuencia la rata como animal de experimentación pero parece más apropiado el conejo ya que su fisiología ósea es más parecida a la humana, finaliza su crecimiento y alcanza madurez esquelética, permitiéndonos obtener resultados más rápidos, cosa que no ocurre con los roedores.⁽⁸²⁾

En la literatura, se describen diversos medios para la medición de variables óseas, entre ellos, La absorciometría fotónica simple (SPA), la absorciometría fotométrica dual (DPA), la radiación X de energía dual (DXA), tomografías computarizadas (TCC),⁽⁸⁹⁾ ultrasonografías⁽⁶⁹⁾ y radiodensitometrías.

En este trabajo, la confirmación de la existencia de osteoporosis se ha realizado utilizando la absorciometría dual fotónica de rayos X (DXA), que permite de una forma precisa y no invasiva obtener la medida de densidad mineral ósea. El densitómetro empleado es el Norland XR-26® 2.3. también utilizado en diversos estudios publicados en la literatura que corroboran la fiabilidad de las medidas obtenidas.^(59,89)

La cirugía para la colocación de un implante lleva consigo una “agresión” al tejido óseo y desencadena un proceso reparativo alrededor del implante que culminará con la integración del mismo en el hueso. La utilización de factores de crecimiento para favorecer la regeneración del hueso es un campo en constante estudio y evolución. Se han realizado estudios experimentales *in vitro* que demuestran su eficacia favoreciendo la regeneración ósea, pero son necesarios estudios en animales ya que la situación que se presenta *in vivo* no son reproducibles cien por cien por los sistemas *in vitro*. En este estudio se utilizan conejas con osteoporosis inducida como modelo de experimentación animal.

Entre los factores de crecimiento relacionados con el remodelado óseo, la hormona de crecimiento (GH) tiene un papel fundamental en el crecimiento del esqueleto y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) cuya secreción es estimulada por la GH actúa como mediador de la misma. El principal secretor de IGF es el hígado, aunque también se produce en otros órganos.^(24,13) El IGF es el

factor de crecimiento más abundante en el hueso y se presentan dos tipos, el IGF-I y el IGF-II. El tipo I es más potente que el IGF-II, por lo que el primero es el más investigado como posible elemento terapéutico para favorecer la regeneración ósea. Diversos estudios demuestran un aumento de formación ósea tras la aplicación de IGF,^(90,91) efecto osteogénico en ratas tras su administración continua.⁽²⁶⁾

EL IGF-I tiene un efecto anabólico, mitogénico, interviniendo en la función, mantenimiento y reparación de muchos tejidos, favoreciendo la diferenciación y proliferación osteoblástica, estimulando la acción del osteoblasto diferenciado, potenciando la formación y mineralización de matriz ósea y disminuyendo la degradación del colágeno. Además interviene en la producción de ADN, de colágeno y de proteínas no colágenas. Se relaciona, junto a la GH, con la activación del cartílago de crecimiento epifisario. Su efecto sobre la osteoclastogénesis no está claro.

En la búsqueda de métodos que favorezcan la osteointegración también se ha estudiado el plasma rico en plaquetas (PRP).⁽¹³⁾

Existen pocos estudios sobre los efectos de la aplicación de IGF-I en la osteointegración de implantes dentales, se ha estudiado la combinación de IGF-I con factor de crecimiento plaquetario (PDGF), o con factor de crecimiento fibroblástico (FGF).⁽⁹²⁾⁽⁹³⁾

Todo esto hace que todas las investigaciones encaminadas a desarrollar métodos o factores que favorezcan la integración de los implantes al hueso, están justificadas, pudiéndose beneficiar de ellas, tanto los pacientes con situaciones más

comprometidas en las que se mejorará la osteointegración y la fiabilidad del tratamiento, como pacientes sanos, en los que al estimular el metabolismo óseo, se podrán mejorar los resultados, así como acortar el tiempo de espera necesario para la rehabilitación protética y por ende el tiempo de tratamiento.

Con este trabajo se persigue estudiar la osteointegración de implantes dentales colocados en tibias de conejas sanas y con osteoporosis inducida y como se modifica dicha osteointegración con la aplicación local de IGF-I.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La aplicación tópica de 4 microgramos (μg) del factor de crecimiento IGF-I, en el lecho quirúrgico, previa a la colocación de un implante osteointegrado en la tibia de un animal de experimentación con osteoporosis inducida mediante ovariectomía y dieta hipocálcica, mejora la osteointegración del mismo.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este estudio es valorar si la administración local de IGF-I puede inducir diferencias cualitativas y/o cuantitativas en la osteointegración de implantes dentales en animales sanos y en animales osteoporóticos.

Para ello se plantean los siguientes **objetivos secundarios**:

1. Constatar la osteoporosis inducida en el modelo de experimentación animal (conejas de 6 meses de la raza Nueva Zelanda) mediante realización de densitometrías, *in vivo*, previas y posteriores a ovariectomía y dieta hipocálcica.
2. Valorar la osteointegración de forma cualitativa, mediante estudio histológico, y de forma cuantitativa, mediante histomorfometría valorando el BIC (*bone-to-implant contact*) en animales sanos y en el modelo animal osteoporótico.
3. Determinar el efecto de la aplicación de IGF-I en la osteointegración en animales sanos y en animales osteoporóticos.
4. Comparar la osteointegración en los distintos grupos ovariectomizados, no ovariectomizados, y en ambos casos con y sin la aplicación de IGF-I.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Material

5.1.1 Animales de experimentación

Este trabajo se ha desarrollado sobre conejas albinas de la raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus Cuniculus*), de seis meses de edad. (Fig. 3)



Fig. 3: Animal de experimentación

Se han formado dos grupos de trabajo, uno formado por veinticinco conejas sobre el que se demostrará la inducción de osteoporosis mediante ovariectomía y dieta hipocálcica y un segundo grupo de dieciséis conejas sobre el que se valorará la osteointegración de implantes dentales y la influencia en la misma de la aplicación de IGF-I.

Los animales proceden del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, donde están alojados en jaulas individuales y con unas condiciones constantes:

- Temperatura estable entre 22°C y 24°C .
- Humedad del 55% al 70%.
- Ventilación de 15 renovaciones por hora.
- Ritmo de luz circadiano: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Para establecer el modelo osteoporótico de experimentación animal, los animales se han sometido a ovariectomía bilateral y en lo referente a la dieta, antes de la intervención, los animales han sido alimentados con dieta estándar de laboratorio (Panlab SL), y una semana después de la ovariectomía, se sometieron a una dieta hipocálcica (Nutrient Requirements of rabbits, 1977, citado por Martín Monge et al.⁽⁹⁴⁾). En todo momento los animales han recibido agua a demanda.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Local de Ética para el Uso de Animales de la UCM. (Anexo)

Sobre el segundo grupo de animales (16 conejas), se han colocado treinta y dos implantes osteointegrados, que serán descritos a continuación, dos por animal, uno en la tibia derecha y otro en la tibia izquierda.

5.1.2 Farmacología

Para el desarrollo de los distintos procedimientos llevados a cabo en este trabajo, realización de densitometrías, ovariectomías, colocación de implantes, ha sido necesario sedar y anestesiarse a los animales y para ello se han seguido las indicaciones del equipo de veterinarios del animalario y se han aplicado las siguientes sustancias farmacológicas: (Fig. 4)

- MIDAZOLAM (Dormicum® Roche).
- CLORHIDRATO DE KETAMINA (Imalgene 1000® Merial Laboratorio S.A. Barcelona).
- XILACINA (Rompún® 2% Química farmacéutica BAYER S.A. Barcelona).

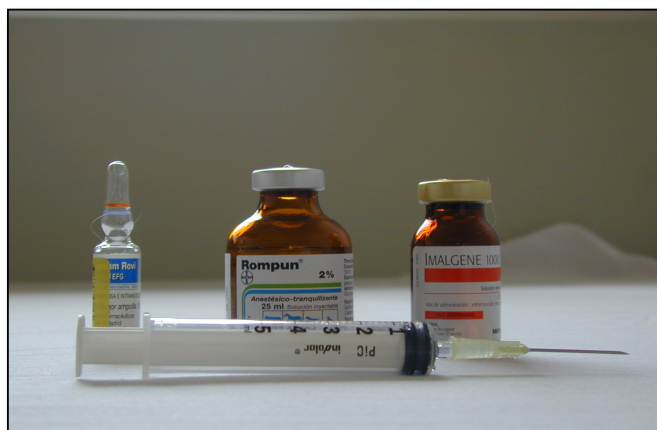


Fig. 4: Fármacos

5.1.3 Absorciómetro

Para las mediciones densitométricas se ha empleado el absorciómetro de rayos X de energía dual (sistema DEXA), denominado NORLAND® XR-26 ubicado en el Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares. (Fig. 5 y 6)

Consta del sistema densitométrico propiamente dicho, de un escáner y de una estación de trabajo.

➤ Sistema densitométrico

Es un absorciómetro de doble energía con doble detector de rayos X y con un sistema de filtrado de Samario para el nivel K.

Para la *calibración* del equipo se utiliza un sistema de 77 tejidos equivalentes para conseguir una excelente linealidad que se realiza automáticamente. La secuencia de calibraciones se almacena en la memoria del aparato para poder revisarlo en cualquier momento.

El equipo está *homologado* por la FDA en todas sus opciones. Tiene *opciones* específicas para espina lumbar, fémur proximal y cuerpo completo. En general sus opciones sirven para cualquier parte del cuerpo definida por el operador.

La *precisión* es aproximadamente de 1,0% sobre un barrido típico de columna y el *tiempo de barrido* es de 5 minutos para un escaneo típico de espina o fémur. La *velocidad de escaneo* es de un máximo de 80mm/s.

El *sistema de posicionamiento* es un sistema inteligente con indicador de rayo láser, rojo de Helio-Neón.

➤ Escáner

El *área activa* del escáner es de 198 cm x 66cm, lo que permite la colocación del paciente en posición de decúbito.

El *sistema de movimiento del brazo*, con motores paso a paso y mediante correas de tracción de kevlar reforzados, consiste en que se puede desplazar tanto en eje X como en el Y, lo que permite movimientos simultáneos en diagonal. Por ello se pueden realizar escáneres perpendiculares a los ejes de los huesos.

Los *parámetros del escáner* son: ancho, alto, resolución, velocidad y paso.

La *velocidad del escáner* puede variar desde 1 mm/s, hasta 10 mm/s en incrementos de 0,1 mm. Una alta velocidad de escáner permite mayor flexibilidad y versatilidad.



Fig. 5: Brazo del escáner

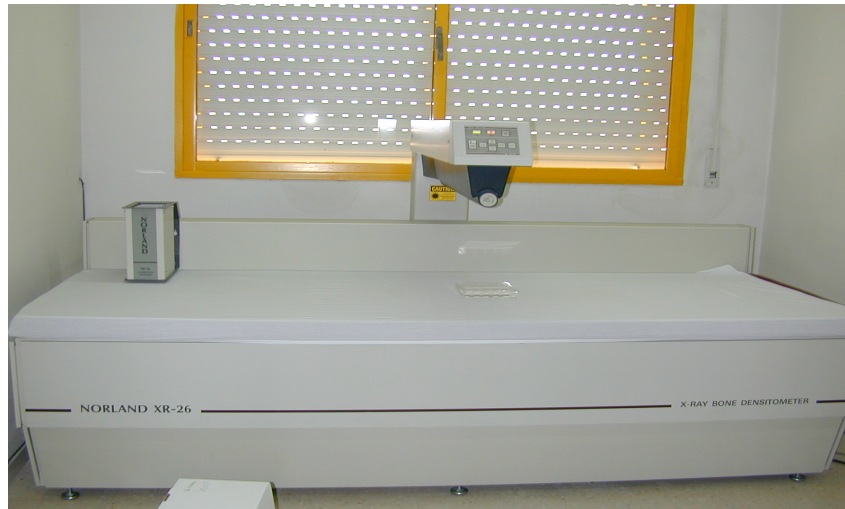


Fig. 6: Mesa y brazo del densitómetro.

El *equipo de rayos X* es un tubo de rayos X de ánodo estacionario. Su potencial es constante de 100 kilovoltios.

La fuente de alimentación es de 12 voltios de corriente continua ultraestable. La corriente máxima del ánodo es de 1mA. La corriente de fuga es de 0,15 mA. Está refrigerado por aceite. Filtro de Samario. Sección focal de 0,9 mm.

Las *ventajas* del tubo son:

- No necesita calentamiento.
- Los dos niveles de energía atraviesan todo el tejido a la vez, mientras que con un sistema de conmutación primero pasa una energía y luego otra.
- No se ocasionan derivas como consecuencia de derivas de la fuente.
- Se puede modificar la salida sin cambiar la potencia de la fuente mediante los ocho niveles de filtrado de Samario.

El *detector de rayos X* es un sistema de dos detectores independientes de cristal de Na para separar las cuentas de los fotones de alta energía de los de baja energía. Esto elimina los errores producidos por el apilamiento fotónico producido por el espectro que genera un tubo de rayos X de varias energías.

El colimador es de 8 mm. La potencia requerida es de 660 watios.

El consumo: 220v/Ac....3,0A

240v/Ac....2,8A

En 50 y 60 Hz. La temperatura de operación es de 15°C a 40°C.

La humedad relativa permitida es de hasta 90%, sin condensación.

➤ **Estación de trabajo**

Es una zona independiente, alejada del lugar de exploración del paciente, que permite el control del escáner, el análisis de los datos y su control posterior. El programa de análisis de los datos es el Norland Bonestar.

5.1.4 Material quirúrgico

En este trabajo se han realizado dos procedimientos quirúrgicos. Uno para realizar la ovariectomía y provocar junto con la dieta hipocálcica una osteoporosis inducida de los animales y otro para colocar los implantes en la tibias de las conejas. En ambos casos, junto al material anestésico, se ha empleado el material quirúrgico necesario para el desarrollo de dichas técnicas.

5.1.4.1 Material para la ovariectomía

Se empleó instrumental quirúrgico de tejidos blandos.

5.1.4.2 Material de la fase implantológica

Para la colocación de los implantes se ha utilizado:

- Instrumental rotatorio a baja velocidad y las fresas propias del sistema de implantes empleado.
- Suero salino estéril para irrigación.
- Implantes: idénticos a los implantes 3i®
 - Titanio puro.
 - Hexágono externo.
 - Roscados, con superficie rugosa.
 - Marca B&W®
 - Medidas: 6 mm de longitud y 3.25 mm de diámetro.
- IGF-I humana, suministrada por Gropep Limited. Se han empleado 4 microgramos de IGF-I en cada implante.

5.1.5 Material para el estudio histológico

Los implantes se colocaron en la parte proximal de las tibias de los animales de experimentación. Una vez sacrificados, se diseccionaron las tibias, retirando todo el tejido blando y se fijaron en formaldehído al 10 % tamponado a pH 7 y se incluyeron en metacrilato para poder cortar el hueso y el titanio simultáneamente y poder estudiar el hueso sin decalcificar

(Donath y Breuner 1982, citado por Martín Monge et al.⁽⁹⁴⁾). Para este proceso se utilizaron los siguientes materiales:

- Formaldehído al 10%.
- Metacrilato (GMA) y Technovit (T-7200®).
- Lámpara ultravioleta de polimerización Exakt®.
- Sistema de corte y pulido Exakt® para conseguir varias preparaciones de cada espécimen de unas 70 micras.
- Tinciones: Tricrómico de Masson, Azul de Toluidina, Hematoxilina-Eosina, según el protocolo seguido por el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares.

Las preparaciones obtenidas fueron analizadas con microscopía óptica. (*Fig. 6*)

5.1.6 Material para el estudio morfométrico.

Las imágenes han sido analizadas con el software MIP-45, sistema avanzado integral de análisis de imagen. DIS S.L. Versión 45.01.0507.

5.1.7 Material fotográfico

Para la realización de las fotografías de los cortes histológicos se ha empleado la cámara digital INFAIMON acoplada a una lupa ZEISS mod. Stemi 2000-C. La imagen ha sido capturada con objetivo 0,63x, aumento de 1.0x y utilizando el software uEye Cockpit. (*Fig. 7*)

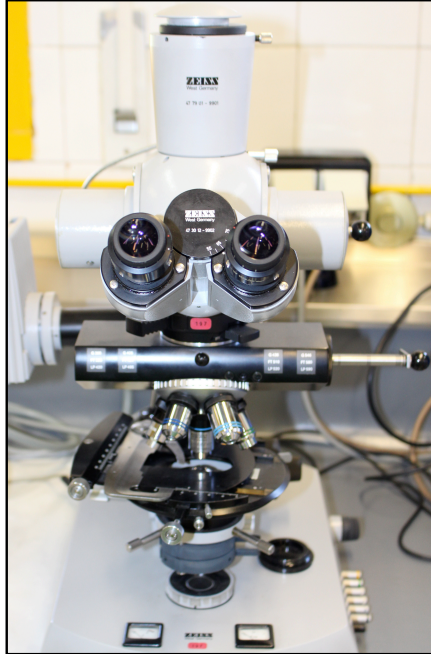


Fig. 6: Microscopio óptico



Fig. 7: Lupa con cámara fotográfica

5.2 Método

5.2.1 Modelo de osteoporosis experimental

En la primera parte de este trabajo, se propone establecer un modelo animal osteoporótico para el estudio de la osteointegración, demostrando la existencia de una osteoporosis inducida, a través de los valores densitométricos obtenidos antes y después de realizar una ovariectomía y someter a los animales a dieta pobre en calcio.

Los animales se someten a dos exploraciones una inicial, previa a la ovariectomía y a la dieta hipocálcica y otra siete semanas después de la intervención, previa anestesia general.

Una vez distribuidos aleatoriamente los animales que participarían en el estudio se identificó a cada uno de ellos mediante un número marcado en el pabellón auricular y se siguió la siguiente sistemática de trabajo:

Establecer el peso del animal y la dosis de medicación

Una vez establecido el peso del animal se calculaban las dosis necesarias de los distintos medicamentos que se iban a administrar.

Sedación

Mediante inyección intramuscular de Dormicum® a la dosis correspondiente según el peso, se conseguía un estado de relajación apropiado para el manejo del animal.

Anestesia

Para conseguir que el conejo permaneciera inmóvil durante la exploración y mantuviera la posición que se marcó para el estudio, se les administró vía intramuscular las dosis correspondientes de xilacina (Rompun® 2%), a razón de 0,25 mg/kg de peso y de clorhidrato de ketamina (Imalgene® 1000), a razón de 0,75 mg/kg de peso.

Análisis densitométrico

El análisis densitométrico se realizó mediante absorciometría dual fotónica de rayos X (DEXA) y se realizaron, como se ha descrito anteriormente, dos

exploraciones por cada animal, una previa y otra posterior a la ovariectomía bilateral más dieta hipocálcica. En ambos casos se tomaron registros de calota y columna cervical y de la tibia derecha de cada animal.

Se estableció un modelo reproducible en todos los animales y en posteriores exploraciones. Para ello se colocó el conejo sobre la camilla del densitómetro, en decúbito prono, con las patas delanteras extendidas en ángulo recto con el tronco, manteniendo la cabeza, el tronco y la cola alineados. Para ello se contó con la ayuda del marcador láser del densitómetro realizando un barrido de cabeza a cola de forma que pasara por la línea media del cuerpo del animal. Con el fin de evitar interferencias en la exploración de columna cervical se fijaron los pabellones auriculares al densitómetro mediante papel adhesivo. Asimismo se fijó la pata trasera derecha de manera que quedara la tibia lo más recta posible, paralela al eje longitudinal de la camilla, utilizando una vez más el marcador láser del aparato. (Fig. 8)

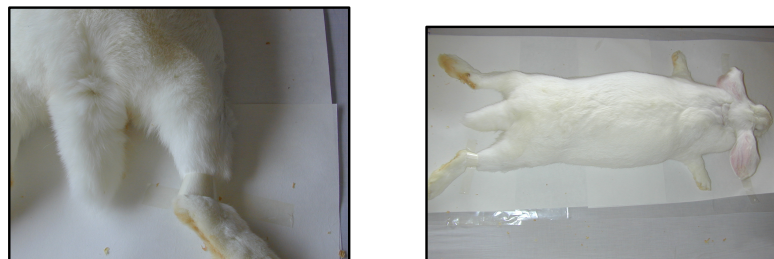


Fig. 8: Posición del animal para la exploración. A: detalle de la tibia. B: Colocación del animal

Una vez posicionado el animal correctamente se introducían los límites de la exploración, en primer lugar los correspondientes a la calota, con un punto en el hocico, otro en la salida de las patas delanteras y un tercer punto lateral al cuello y

ventral a la salida de la pata delantera derecha. Posteriormente se marcaron los límites de exploración para la tibia con un primer punto craneal a la articulación de la rodilla, otro punto distal al tobillo y un tercero lateral (por fuera y a la derecha) al punto medio de la longitud de la tibia.

Los parámetros empleados en las mediciones fueron la velocidad y la resolución máximas que permite el aparato en función del tamaño del espécimen a estudiar:

Velocidad de escaneo: 40 mm/s.

Resolución de exploración: 1 mm x 2 mm.

Resolución de medición: 1 mm x 1 mm.

Como paso previo a la exploración se realizaba el calibrado del densitómetro usando el Norland phanthom.

Todas las exploraciones densitométricas fueron realizadas por el mismo operador y los datos y las imágenes fueron registradas en un ordenador para ser analizadas utilizando el software del sistema. (*Fig. 9*)

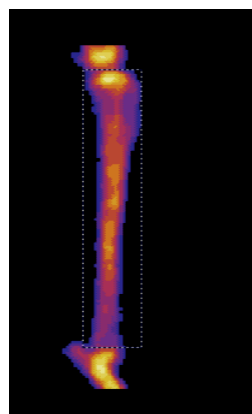
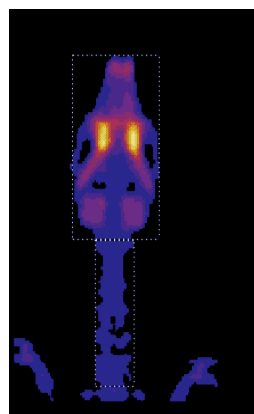
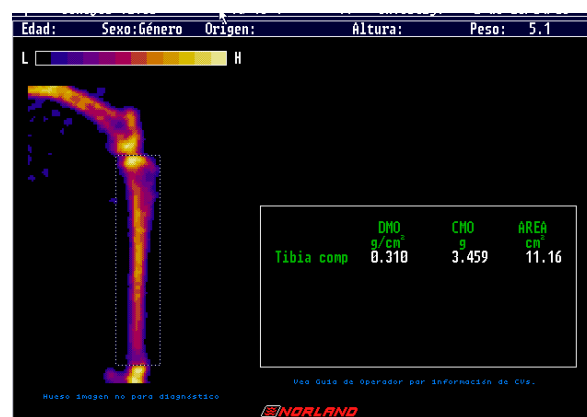
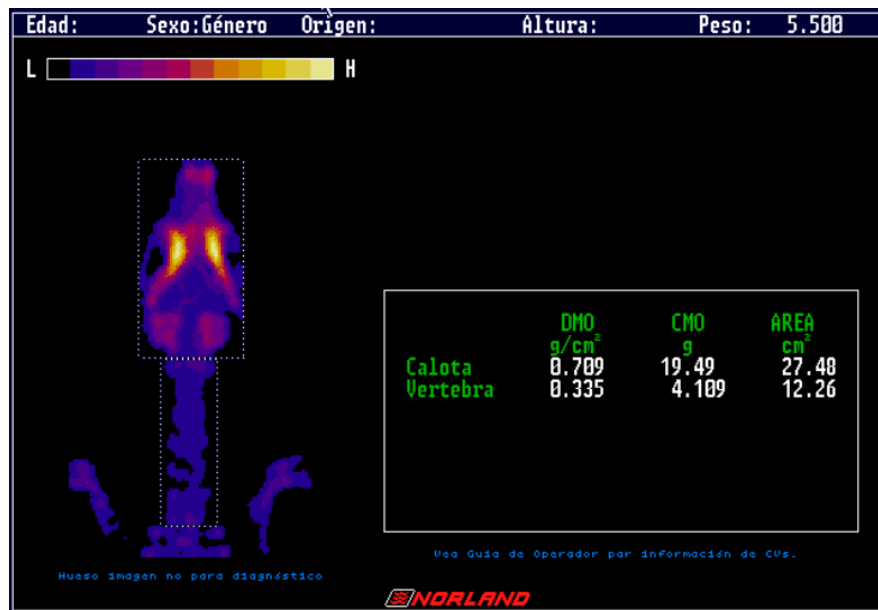


Fig.9: Imágenes captadas por el software del densitómetro. Detalle de las zonas exploradas.

Las mediciones obtenidas se corresponden con:

- ÁREA ÓSEA: superficie de hueso analizado. Se mide en cm^2
- CONTENIDO MINERAL ÓSEO (CMO): se mide en gramos.
- DENSIDAD MINERAL ÓSEA (DMO): es el resultado de dividir el CMO entre el área. Se mide, por tanto, en $\text{gramos}/\text{cm}^2$.

5.2.1.1 Ovariectomía

Las intervenciones quirúrgicas para extirpar los ovarios, se realizaron pasada una semana de la primera exploración densitométrica, en el quirófano del animalario de la Facultad de Medicina de la UCM. Los animales fueron anestesiados siguiendo el protocolo descrito con anterioridad, el campo quirúrgico se rasuró y se pintó con solución yodada (Betadine®). Tras incisión y localización del ovario se realizaron unos puntos pasantes para la oclusión de los vasos sanguíneos y finalmente se extirparon ambos ovarios. Para el desarrollo de la técnica quirúrgica se utilizó el instrumental quirúrgico propio de la intervención. (*Fig. 10 y 11*)



Fig. 10: Localización del ovario.



Fig. 11: Ovario

Posteriormente, se les administró, vía oral, tratamiento antibiótico (oxitetraciclina).

5.2.1.2 Dieta

Tras la cirugía, los animales recibieron dieta estándar de laboratorio (Panlab SL), con un contenido en calcio del 0,45% durante una semana para

favorecer su recuperación y pasada la primera semana tras la ovariectomía, pasaron a someterse durante un mes y medio, (seis semanas) a una dieta hipocálcica según Nutrient Requirements of rabbits, 1977, con un 0,07% de calcio, (citado por Martín Monge et al ⁽⁹⁴⁾). Los animales tenían agua a su disposición para consumirla a demanda.

La dieta hipocálcica contiene:

- Cebada: 74,2%
- Salvado de trigo: 20%
- Soja: 5%
- Sal: 0,3%
- Corrector: 0,5%

Durante las exploraciones se obtuvieron dieciocho valores de cada coneja, nueve iniciales y nueve post-ovariectomía y dieta hipocálcica. De los nueve valores, tres pertenecen a la calota, otros tres a las vértebras y tres a la tibia.

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico para corroborar la existencia o no de una osteoporosis inducida.

5.2.2 Estudio de osteointegración

5.2.2.1 Fase implantológica

Esta parte del trabajo, se llevó a cabo sobre 16 conejas. Se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos, un primer grupo de 8 conejas con osteoporosis inducida mediante ovariectomía y dieta hipocálcica y que se denominó

ovariectomizadas (OVX), y un segundo grupo, al que se realizó una falsa ovariectomía (sham), pero no se le privó de calcio, recibiendo una alimentación estándar, que se denominó SANOS. Para la inducción de la osteoporosis se procedió como se ha descrito anteriormente.

Sobre estos animales se colocaron, bajo anestesia general, implantes dentales con el objetivo de estudiar la osteointegración de los mismos en animales osteoporóticos, en animales sanos y cómo se ve modificada dicha osteointegración en función de la presencia o no de IGF-I.

Los implantes de titanio, monocorticales, se colocaron en la parte proximal de las tibias, un centímetro por debajo de la tuberosidad tibial anterior, en la cara medial, donde no hay inserciones musculares que pudieran dificultar la técnica. Se colocó un implante en la tibia izquierda y otro en la tibia derecha. (*Fig. 12*) A seis de los animales, (tres SANOS y tres OVX), se les colocaron los implantes sin ninguna sustancia adicional y pasaron a ser grupo control y a otros diez animales (cinco SANOS y cinco OVX) se les colocaron los implantes introduciendo, previamente en el lecho quirúrgico, 4 microgramos de IGF-I (Gropep Limited®).

Los grupos de estudio quedaron como se describe a continuación: (*Tabla 8*)

GRUPO	Nº DE IMPLANTES
CONTROL/SANOS	6
CONTROL/OVX	6
IGF-I/SANOS	10
IGF-I/OVX	10

Tabla 8: Distribución de grupos de estudio.

Para esta fase quirúrgica se empleó el material descrito anteriormente. Tras anestesia de los animales y desinfección con povidona yodada (Betadine®) de la zona, se realizó incisión de espesor total, despegamiento y se preparó el lecho implantario con las fresas propias del sistema, a baja velocidad (inferior a 800 r.p.m.) y bajo abundante irrigación con suero salino. Se colocaron los implantes estériles y en los animales seleccionados se depositó previamente, en el lecho implantario, cuatro microgramos de IGF-I. Finalmente se suturó por planos la herida quirúrgica utilizando sutura reabsorbible y seda. Se les administró tratamiento antibiótico con oxitetraciclina. (Fig. 12)

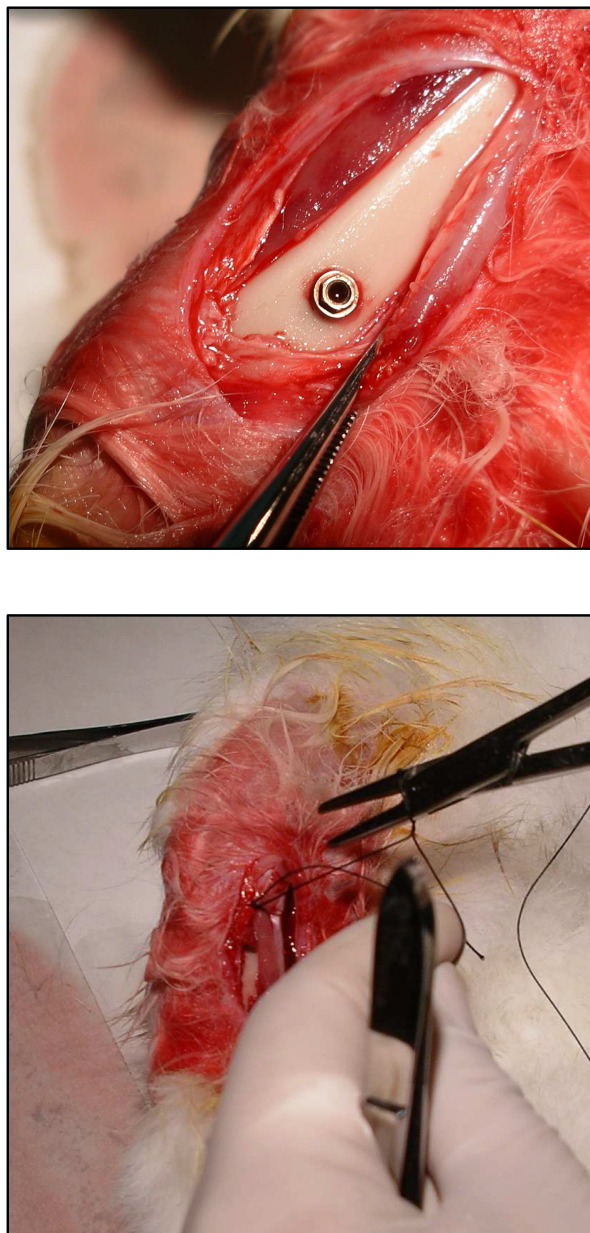


Fig. 12: Cirugía para la colocación de los implantes

Pasadas dos semanas de la cirugía de colocación de implantes, los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico IV inyectado a dosis letal, 50 mg/Kg.

5.2.2.2 Preparación de las muestras

A las 2 semanas de la cirugía de la colocación de los implantes, se sacrificaron los animales. (*Fig.13 y 14*) Se diseccionaron las tibias y se sumergieron en una solución tamponada a pH 7 de formaldehído al 10%. Las muestras se incluyeron en 2-hidroxietilmetacrilato (GMA) y en Technovit 7200® fotopolimerizable. Para ello se sumergieron en concentraciones crecientes, durante dos meses, para que toda la muestra quedara embebida por dicha sustancia. (Donath y Breuner, 1982, citado por Martín Monge et al.⁽⁹⁴⁾). Tras la polimerización dos horas en luz blanca y seis horas en luz azul con la lámpara ultravioleta Exakt®, se consiguió un bloque homogéneo sobre el que se podían realizar cortes y conseguir muestras para analizar. (*Fig.15*)

El bloque inicial de metacrilato, se cortó con el sistema de corte y pulido Exakt® para conseguir varias preparaciones de cada espécimen de unas 70 micras. (*Fig.16*). Posteriormente se procedió a teñir las muestras con Tricrómico de Masson, Azul de Toluidina, Hematoxilina-Eosina, según el protocolo seguido por el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares y se procedió a su análisis histológico con microscopía óptica y a análisis morfométrico con el software MIP-45 Advance, sistema avanzado integral de análisis de imagen. (*Fig.17*)

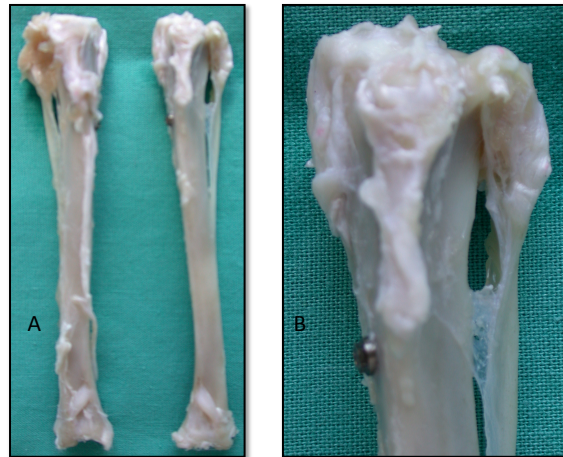


Fig.13: A) Imagen de los implantes colocados en las tibias.

B) Detalle de la anterior.

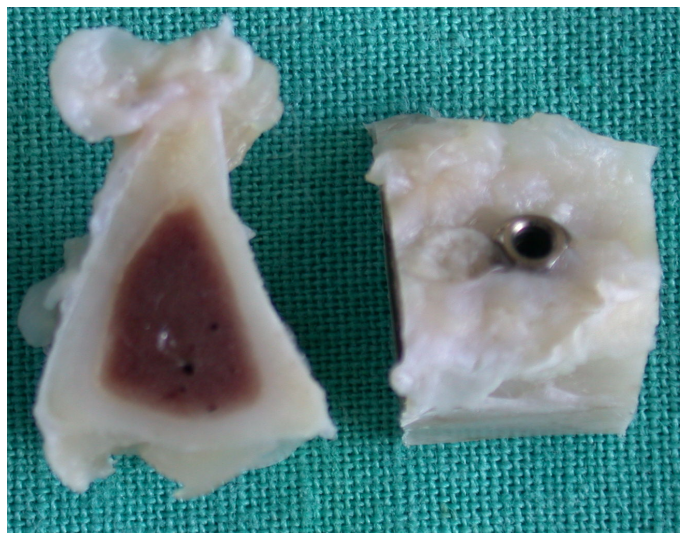


Fig.14: Bloque de tibia que contiene el implante.

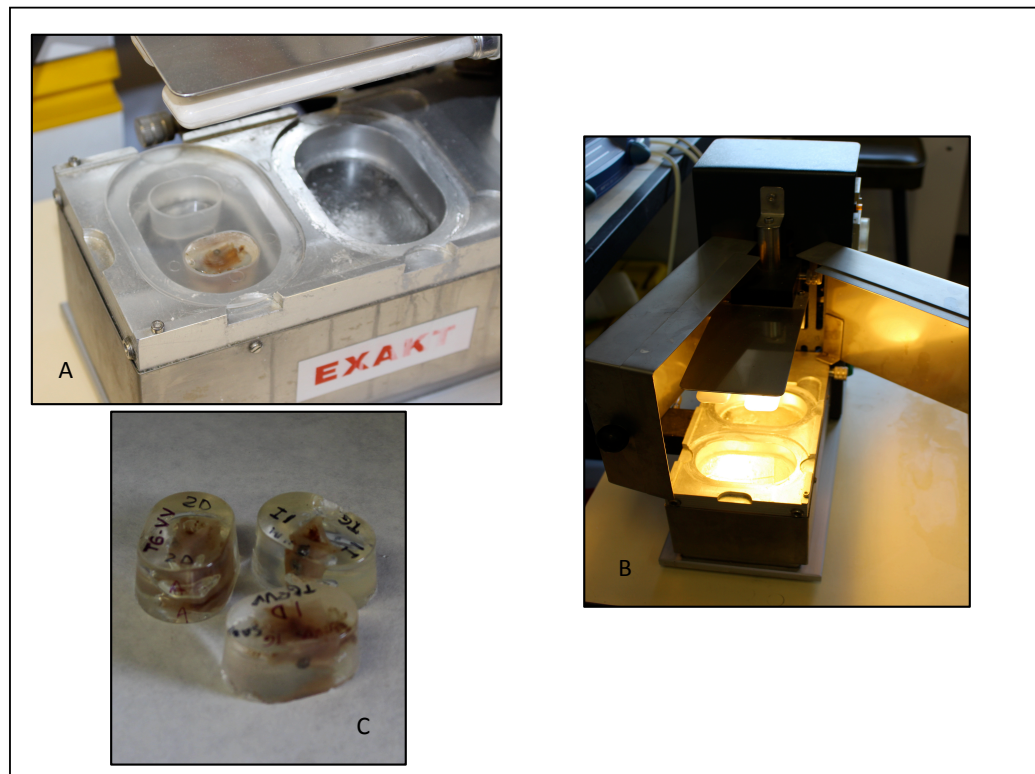


Fig.15: Preparación de los bloques de metacrilato. A y B) Fotopolimerización. C) Bloque polimerizado



Fig.16: Obtención de las preparaciones.

- A) Detalle de la cortadora.
- B) Pulidora.
- C) Tinciones.

5.2.2.3 Estudio histomorfométrico

En primer lugar se analizaron las muestras mediante microscopio óptico. En el *estudio histológico* se han analizado:

- Cambios en toda la cortical del hueso, tanto en endostio como en periostio.
- La cortical atravesada por el implante.
- La respuesta tisular alrededor del implante dentro de la cavidad medular.

Para ello se realizaron las tinciones Tricrómico de Masson, Azul de Toluidina, Hematoxilina-Eosina, según el protocolo seguido por el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares.

Tricrómico de Masson: (Fig.17)

- Evidencia las fibras colágenas.
- El tejido óseo calcificado se tiñe en verde.
- El tejido osteoide no calcificado en naranja-rojo.
- El conjuntivo se tiñe en rojo.
- Los núcleos se tiñen en azul negruzco.

Hematoxilina- Eosina: (Fig.18)

- Da una tinción de conjunto.
- Permite diferenciar células, la hematoxilina tiñe el núcleo y la eosina el citoplasma.

Azul de Toluidina: (Fig.19)

- Nos permite observar mucopolisacáridos ácidos, que se tiñen en rojo o púrpura.
- El resto de la preparación se tiñe de azul.
- Permite observar células óseas que se tiñen ortocromáticamente.

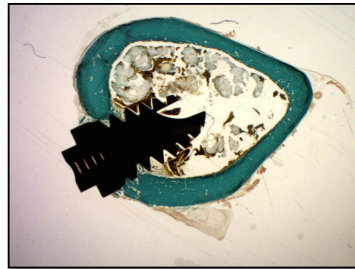


Fig.17: Tricrómico de Masson.

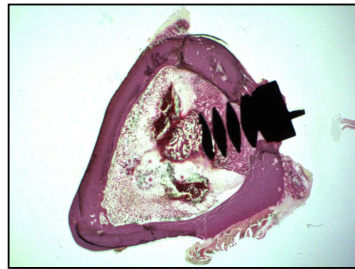


Fig.18: Hematoxilina-Eosina

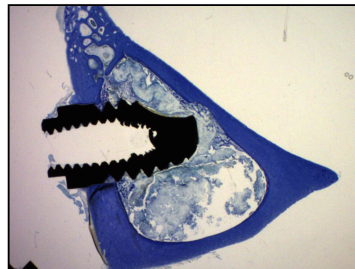
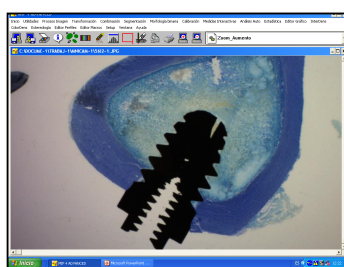


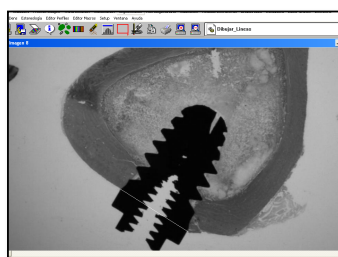
Fig.19: Azul de Toluidina

En el **estudio morfológico**, se cuantifica la reacción ósea alrededor del implante. Las imágenes de las muestras fueron tomadas con la cámara fotográfica digital INFAIMON acoplada a una lupa óptica ZEISS mod. Stemi 2000-C. La imagen ha sido capturada con objetivo 0,63x, aumento de 1.0x y utilizando el software uEye Cockpit. Se utilizó un sistema avanzado integral de análisis de imágenes denominado MIP-45.

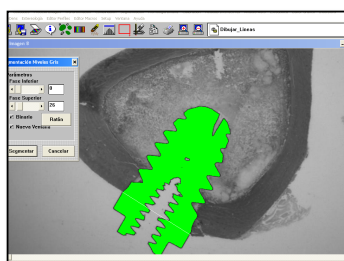
Mediante el MIP-4, se segmentaron las imágenes de manera que se podía estudiar la zona de implante en contacto con hueso prescindiendo del resto de la muestra. En las siguientes imágenes se resume el método de análisis. (Fig.20)



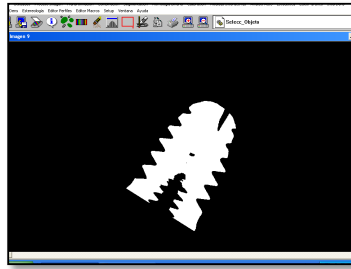
Selección de la imagen.



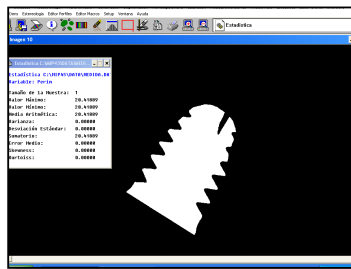
Niveles de grises y línea de cierre.



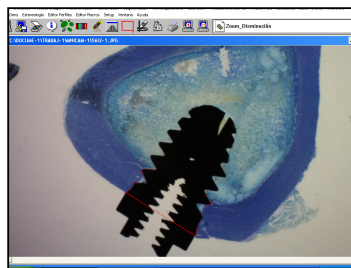
Segmentación



Relleno y conteo de objetos.



Medición de área y perímetro.



Contacto hueso-implante.

Fig.20: Secuencia del método de análisis

Una vez segmentadas, en las imágenes se medía:

- **Línea de cierre:** Se traza una tangente al hueso cortical a nivel de la cabeza del implante. Esta línea separa la parte del implante que queda dentro de hueso de la que queda fuera del mismo.
- **Área del implante:** se define como la superficie del implante que queda dentro de hueso. No se considera la parte del implante que queda fuera de la cortical.

- **Perímetro del implante:** Tampoco se considera el implante que queda fuera de la cortical.
- **Perímetro de estudio:** es la diferencia entre el perímetro total del implante y la línea de cierre.
- Superficie de **hueso en contacto** directo con el implante.
- **Bone-to-implant-contact (BIC):** Se define como el porcentaje de osteointegración o índice de afinidad de cada preparación.

Para determinarlo se calcula un porcentaje, dividiendo la cantidad de hueso en contacto con el implante entre el perímetro de estudio y multiplicando por cien.

Una vez realizadas todas las mediciones para las distintas preparaciones de cada tibia, se realizó una media aritmética con todos los valores de BIC obtenidos y se obtuvo un BIC medio para cada tibia.

5.2.3 Tratamiento estadísticos de los datos

5.2.3.1 Análisis estadístico de datos de densitometría

Con todos los datos obtenidos en las exploraciones densitométricas, se realizó un estudio estadístico para obtener los resultados. Se aplicó el test de muestras pareadas con el programa informático SPSS22 y se obtuvieron las medias con su desviación estándar y se consideró estadísticamente significativo una $p < 0,05$. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (R) para establecer la correlación entre las diferencias de DMO inicial y final entre los distintos grupos.

5.2.3.2 Análisis estadístico de datos del estudio morfométrico

Se utilizó el programa informático SPSS22 y se aplicó un análisis de la varianza para dos factores y prueba T para comparación de dos medias. Por el tamaño muestral del que se dispone, al tratarse de una experimentación animal, se establece un $p < 0,10$ para la significación de los resultados. Se estudia la influencia de los factores IGF-I y ovariectomía en los valores de BIC.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

Los resultados se dividen en dos apartados. Por un lado los encaminados a confirmar la osteoporosis inducida en nuestro modelo de experimentación animal, y por otro los relacionados con la integración de los implantes en animales sanos y osteoporóticos, así como los efectos de la aplicación o no de IGF-I local previa a la colocación de implantes dentales en las tibias de los animales en ambos grupos.

6.1 Pesos

El peso medio de los animales del primer grupo en el momento del estudio era de 5,3 Kg y para la segunda fase del trabajo, los animales presentaban un peso comprendido entre 4 y 5 Kg.

6.2 Densitometrías *in vivo*

En nuestro trabajo se ha utilizado como animal de experimentación el conejo hembra de la raza Nueva Zelanda, de 6 meses de edad y se ha conseguido un modelo osteoporótico sometiendo a los animales a ovariectomía bilateral y posterior dieta baja en calcio durante seis semanas. Para confirmar la osteoporosis experimental se realizaron densitometrías mediante DEXA, antes y después de la cirugía y la dieta midiendo valores de DMO en calota, tibia y columna cervical de los animales.

Los valores obtenidos confirman una disminución de la densidad mineral ósea en las tres zonas exploradas (calota, tibia y columna cervical), siendo

estadísticamente significativos los datos referentes a calota y columna cervical ($p < 0,05$). Además existe correlación estadísticamente significativa entre las DMO de calota y columna cervical y de tibia y columna cervical.

En la siguiente tabla se muestran los valores media y desviación estándar de la DMO comentados: (Tabla 9)

Región analizada	DMO Inicio (mg/cm ²)	Desviación estándar	DMO Post Ovariectomía (mg/cm ²)	Desviación estándar	Test <i>t</i>
Tibia	0,33	±0,019	0,32	±0,031	0,1020
Calota	0,71	±0,039	0,67	±0,047	0,0005
Columna cervical	0,33	±0,023	0,30	±0,023	0,0013

Tabla 9 : Densidad mineral ósea antes y después de ovariectomía y dieta hipocálcica

6.3 Fase implantológica

Tras la confirmación del modelo de experimentación con osteoporosis inducida, se colocaron implantes dentales en los distintos grupos de estudio para valorar la osteointegración mediante estudio histológico y estudio morfométrico, en animales osteoporóticos, en animales sanos y cómo se ve modificada dicha osteointegración en función de la presencia o no de IGF-I. Los cuatro grupos establecidos en el estudio son por un lado animales ovariectomizados y no

ovariectomizados a los que no se les ha añadido IGF-I en el lecho implantario, (CONTROL/OVX y CONTROL/SANOS), y por otro lado animales ovariectomizados y no ovariectomizados a los que sí se les ha añadido IGF-I en el momento en el que se colocaron los implantes (IGF-I/SANOS y IGF-I/OVX).

6.3.1 Análisis histológico

En este apartado se describe la respuesta del tejido óseo en los diferentes grupos analizados mediante observación en la lupa y en el microscopio óptico.

En el grupo **CONTROL/SANOS**: Se observa una histología ósea habitual: hueso cortical compacto con presencia de osteonas en el hueso ya maduro.

La formación ósea alrededor del implante se aprecia únicamente a nivel de la cortical, prácticamente no aparece tejido óseo neoformado en la cavidad medular. En las cercanías del implante se observan trabéculas óseas neoformadas a partir del endostio y aparece escaso hueso neoformado a expensas del periostio.
(Fig. 21- 25)

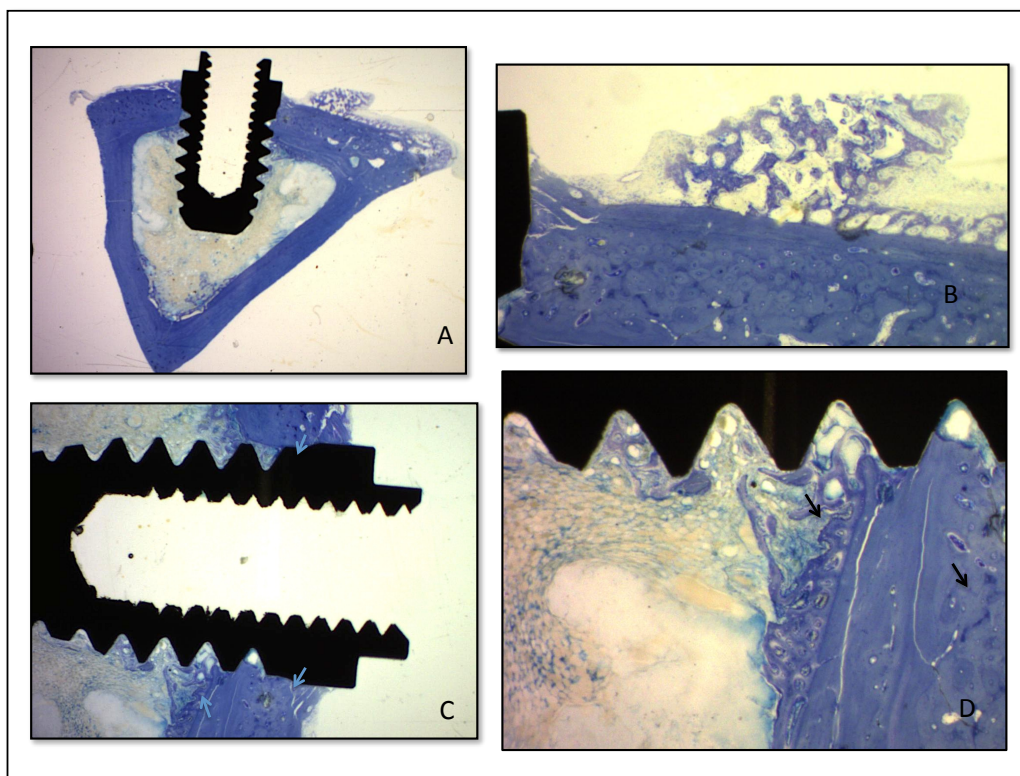


Fig.21: Grupo CONTROL/SANOS: Tinción Azul de Toluidina.

- A) *Aspecto global de la osteointegración.*
Imagen de lupa a 10 aumentos. Osteointegración a nivel cortical.
Prácticamente no hay tejido óseo neoformado a nivel medular.
- B) *Hueso neoformado a partir del periostio.* Detalle de la anterior. A 40 aumentos.
- C) *Detalle de la osteointegración en la cortical.* Imagen de lupa a 25 aumentos.
Trabéculas óseas formadas a expensas del endostio.
- D) Las flechas señalan el frente de osteoblastos en las trabéculas de neoformación y osteonas en el hueso maduro. Detalle de la anterior. Imagen a 50 aumentos.

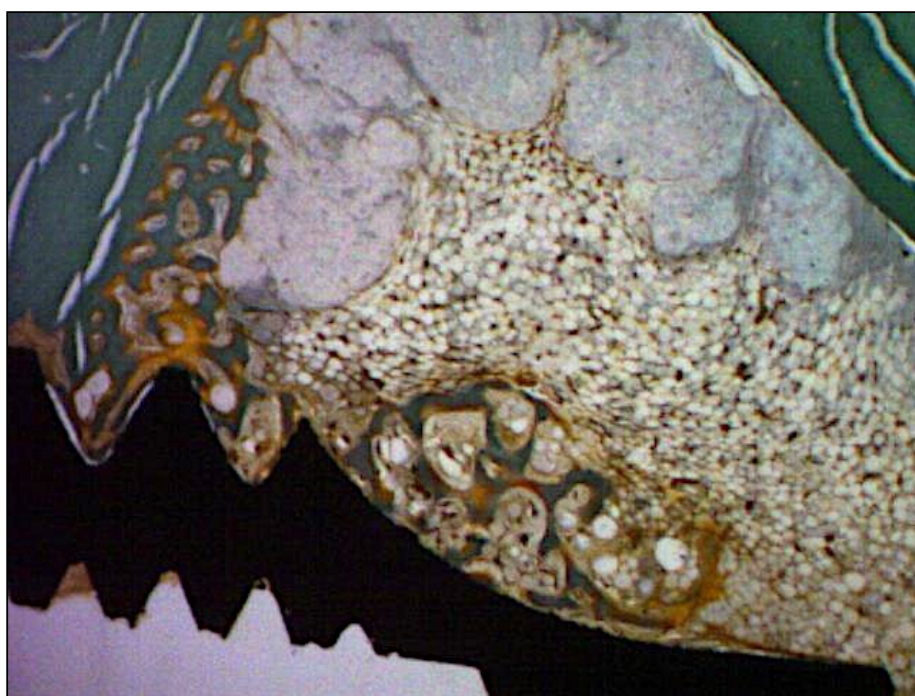


Fig. 22 y 23: Grupo **CONTROL/SANOS**: Detalle de la neoformación ósea. Aparece tejido osteoide formado a partir del endostio (color naranja) rodeando a las trabéculas de neoformación. Tinción Tricrómico de Masson a 25 y 50 aumentos respectivamente.

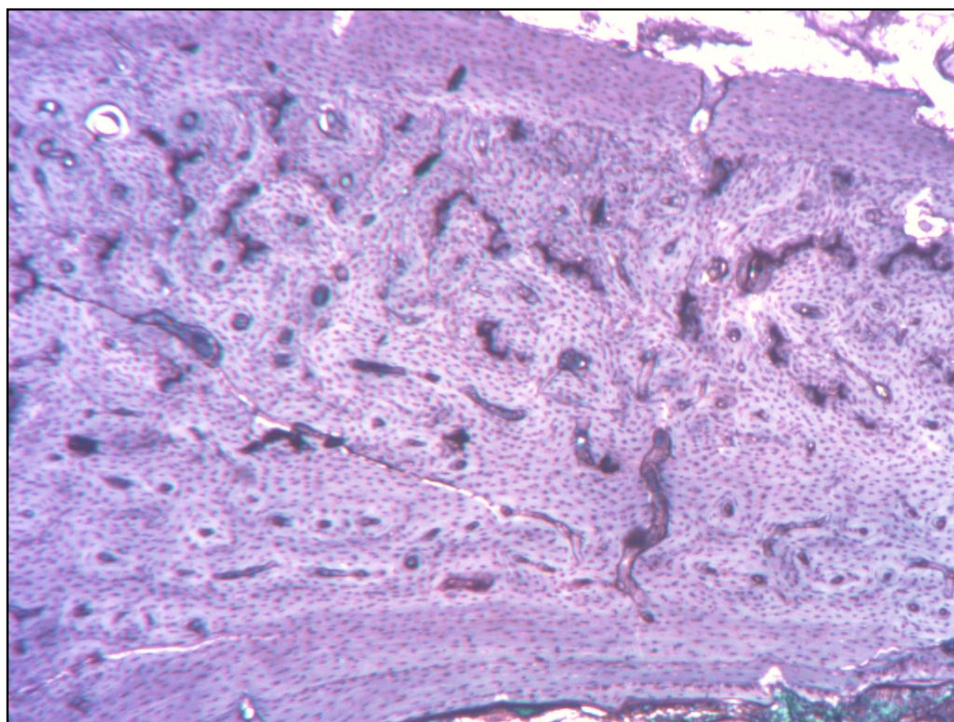


Fig. 24: Grupo **CONTROL/SANOS**: Detalle de cortical. Se aprecia mucha actividad con zonas de remodelación, presentándose como zonas de color más intenso. Se reconoce el aspecto habitual del hueso compacto: osteonas en la zona central y láminas circunferenciales en la región interna y externa de la cortical. Imagen de microscopio óptico. 2,5x.

En el grupo **CONTROL/OVX**: Se observa cortical ósea compacta con menor actividad neoformadora que en el grupo anterior y mayor presencia de tejido osteoide, no calcificado. Escasa presencia de trabéculas neoformadas a partir del endostio. (Fig. 25 y 26)

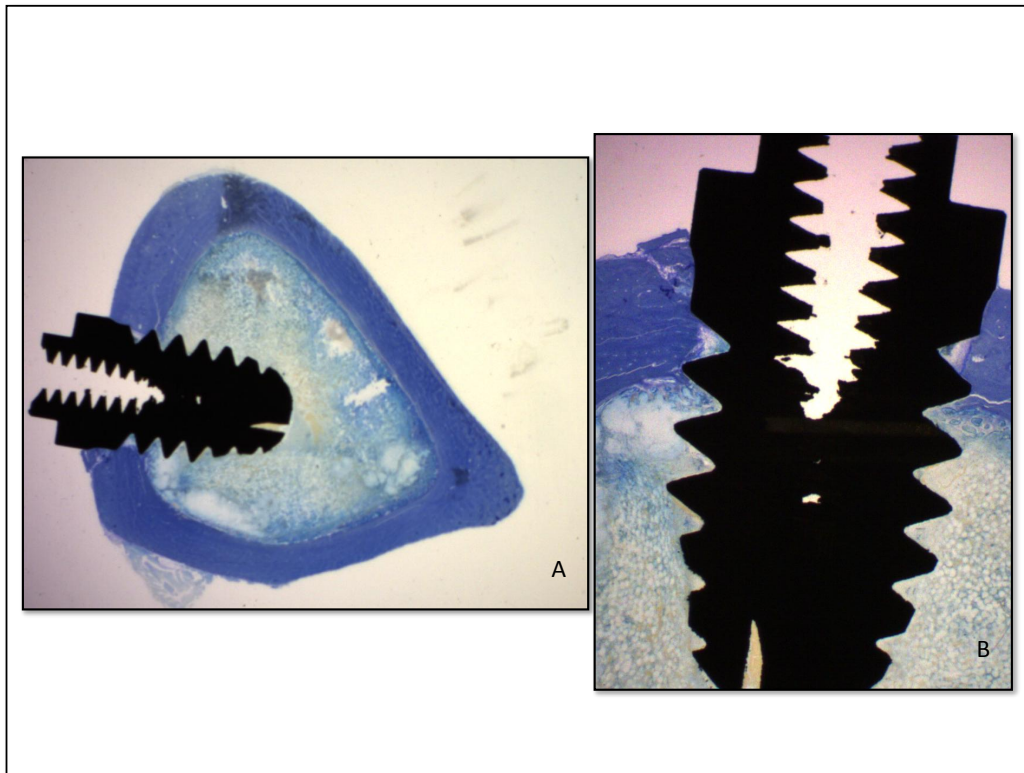


Fig. 25: Grupo **CONTROL/OVX**: Tinción Azul de Toluidina.

A) Corte transversal de animal osteoporótico. 10 aumentos.

B) Escasa presencia de trabéculas óseas a partir del endostio. 25 aumentos.

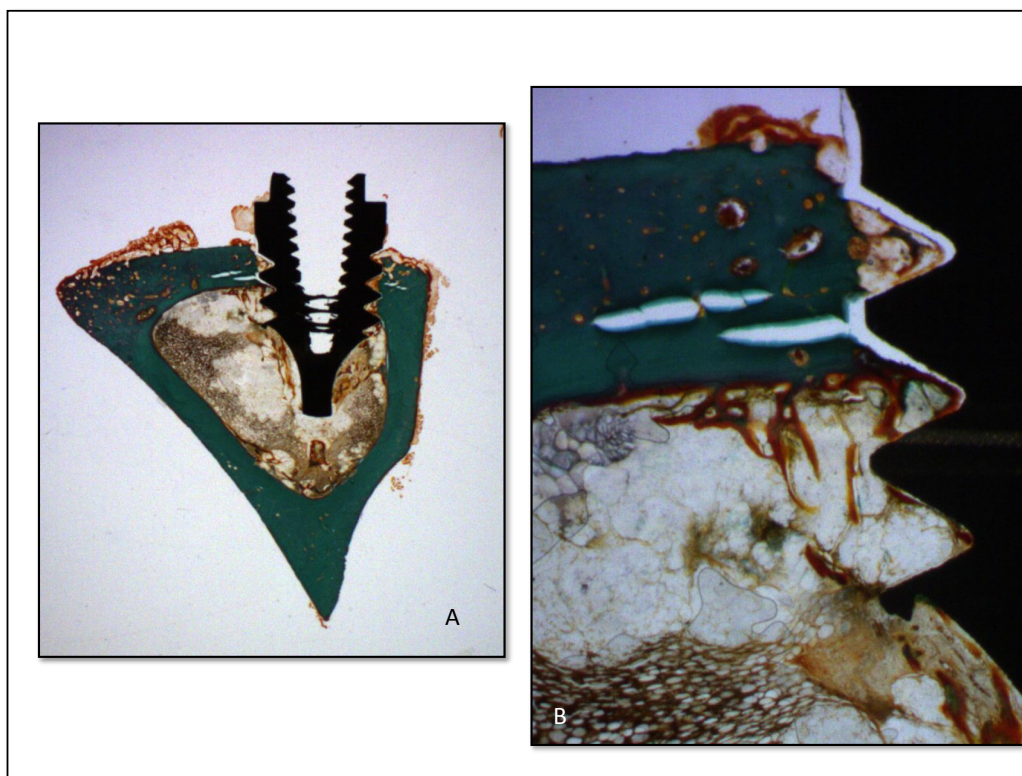


Fig. 26: Grupo **CONTROL/OVX**: Tinción Tricrómico de Masson.

A) Corte transversal, visión general. Imagen a 10 aumentos.

B) Detalle de las trabéculas óseas neoformadas. 50 aumentos. Las trabéculas toman un color anaranjado. Se observa el tejido osteoide, formando trabéculas escasas y muy delgadas.

En el grupo **IGF-I/SANOS**: Se aprecia osteointegración con características histológicas similares a la de los grupos control. Se observan trabéculas neoformadas, cortas y delgadas, propias de hueso joven, dirigidas al implante desde la cortical. (Fig. 27- 30)

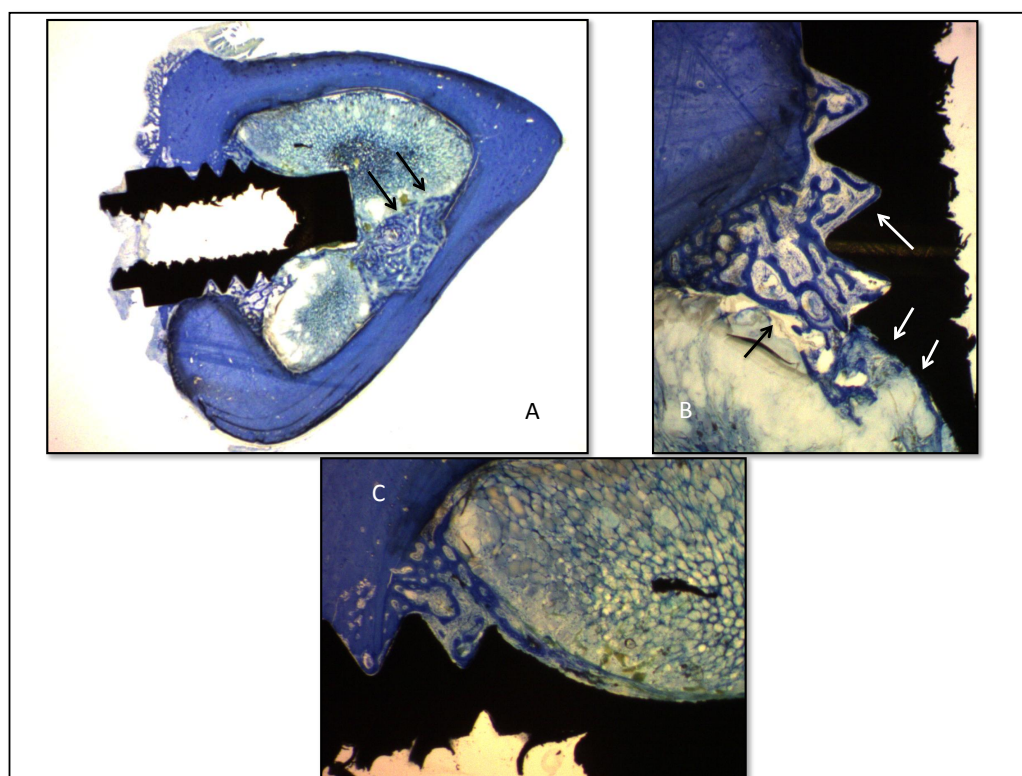


Fig. 27: Grupo **IGF-I/SANOS**: Tinción Azul de Toluidina.

- A) *Visión general de osteointegración.* Imagen de lupa a 10 aumentos. Se observa neoformación, con trabéculas finas y cortas desde la cortical contraria.
- B) *Detalle de la anterior.* Se observa contacto íntimo del hueso trabecular neoformado con la superficie del implante. Imagen de lupa a 50 aumentos.
- C) *Frente de osteoblastos.* Actividad de neoformación. Imagen de lupa a 50 aumentos.

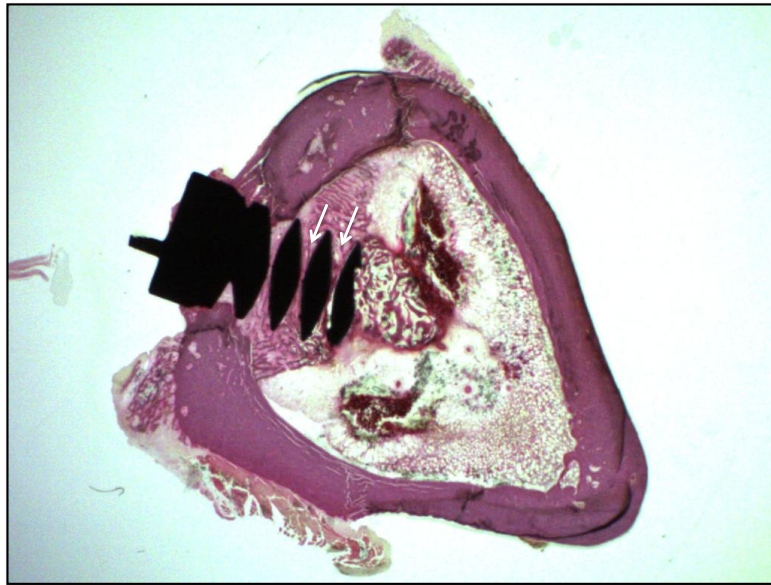


Fig. 28: Grupo *IGF-I/SANOS*: Tinción de Hematoxilina eosina. Corte muy lateral del implante. Se observan espiras sueltas, lo que permite distinguir trabéculas entre las espiras.

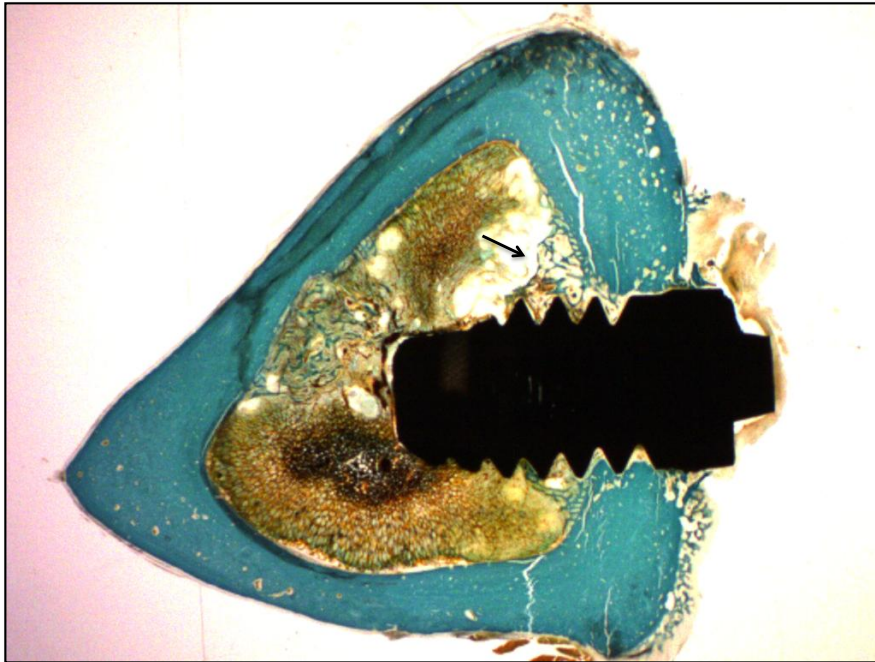


Fig. 29: Grupo *IGF-I/SANOS*: Tinción Tricrómico de Masson. Imagen de lupa a 10 aumentos. Las trabéculas son escasas, muy delgadas y poco densas.

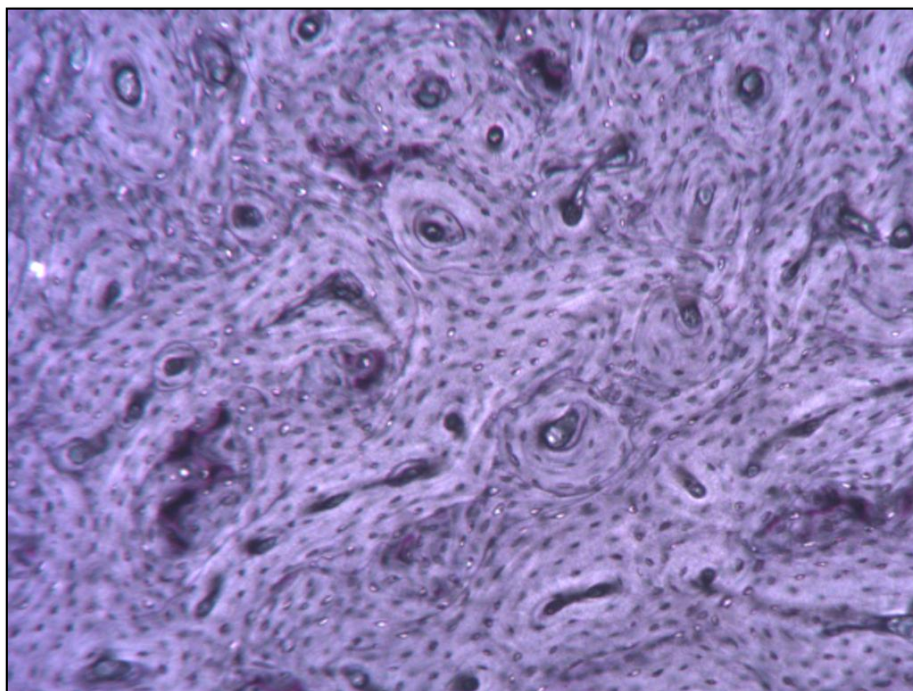


Fig. 30: Grupo **IGF-I/SANOS**: Cortical normal: presencia de osteonas. Poca actividad. Tinción Azul de Toluidina. Imagen de microscopio óptico 6x.

En el grupo **IGF-I/OVX**: Se observan trabéculas cortas y delgadas características de los animales osteoporóticos que hemos analizado anteriormente. Se aprecia poca actividad ósea, escasa formación de trabéculas y de tejido osteoide. Al mismo tiempo hay poca actividad regenerativa en la cortical contraria a diferencia del grupo de animales no ovariectomizado. (Fig. 31-33)

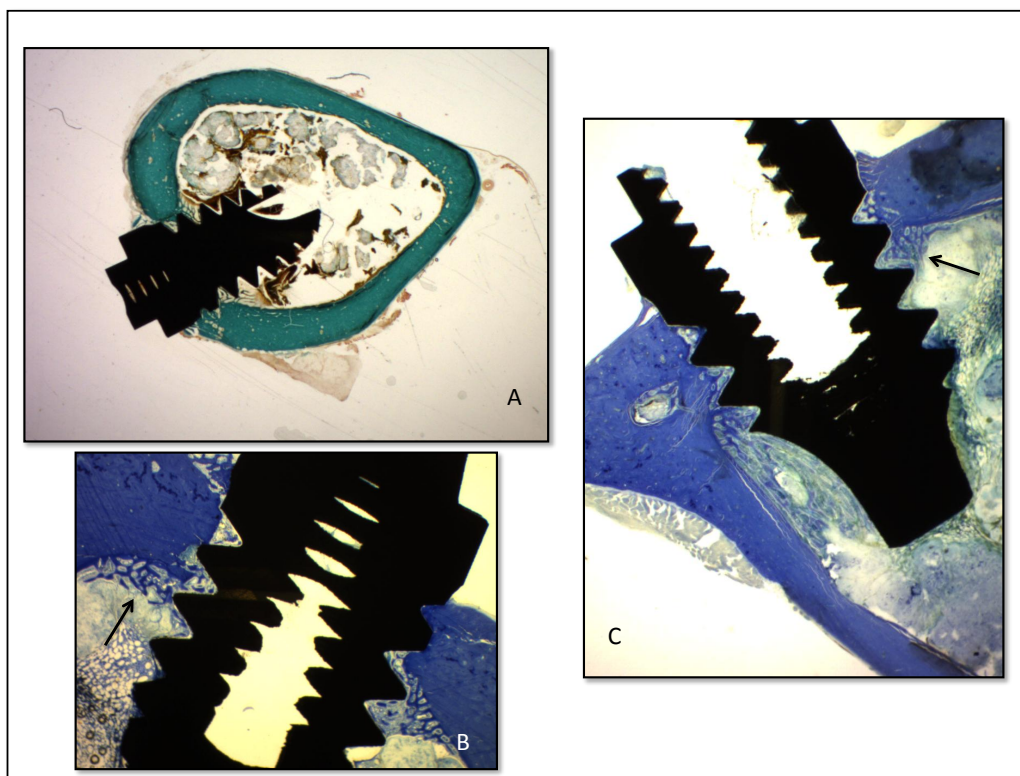


Fig. 31 : Grupo IGF-I/OVX:

- A) *Vista general de la osteointegración.* Presenta escasa actividad ósea. Con muy poca formación de trabéculas y de tejido osteoide. Tinción Tricrómico de Masson. Imagen de lupa a 10 aumentos.
- B) *Detalle de osteointegración.* Se observan trabéculas óseas pero no llegan a contactar con el implante. Tinción Azul de Toluidina. Imagen de lupa a 30 aumentos.
- C) Trabéculas desde el endostio poca actividad perióstica. Tinción Azul de Toluidina. Imagen de lupa a 20 aumentos.

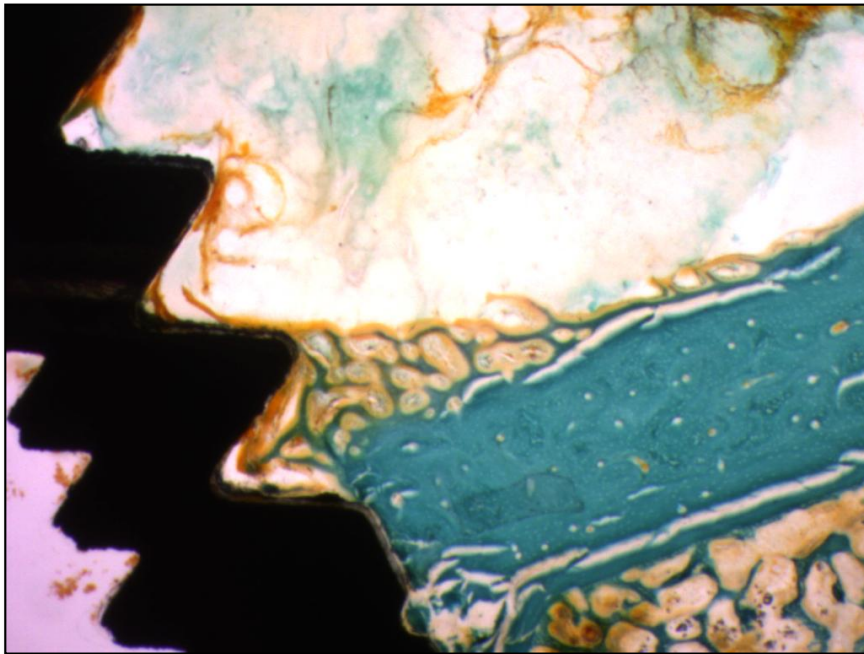


Fig. 32: Grupo *IGF-I/OVX*: Detalle de trabéculas cortas y delgadas. Tinción Tricrómico de Masson. Imagen de lupa a 50 aumentos.

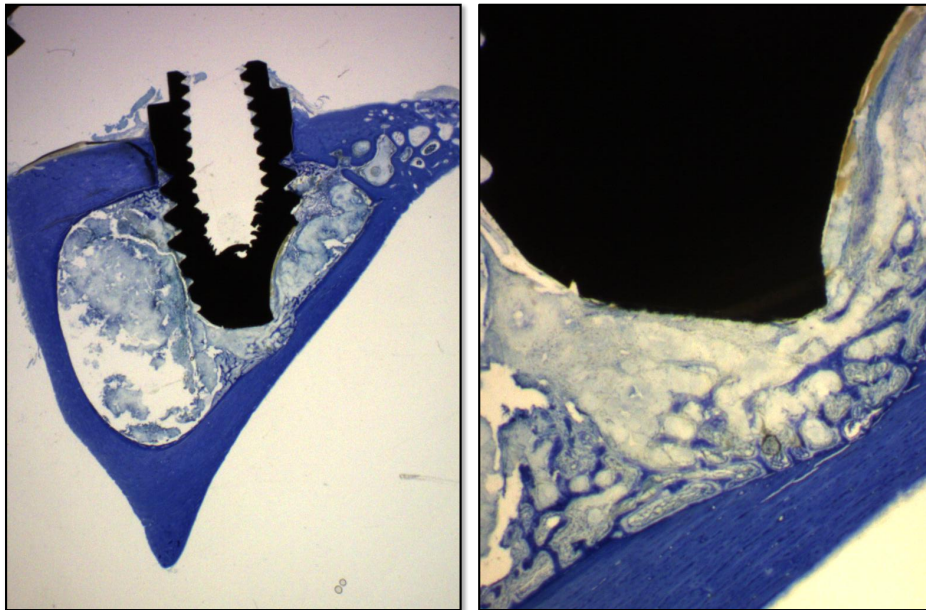


Fig. 33: Grupo **IGF-I/OVX**: Detalle de escasa regeneración en cortical contraria.

- A) *Visión general.* Tinción Azul de Toluidina. Imagen de lupa a 10 aumentos.
- B) *Detalle de la anterior* a 50 aumentos.

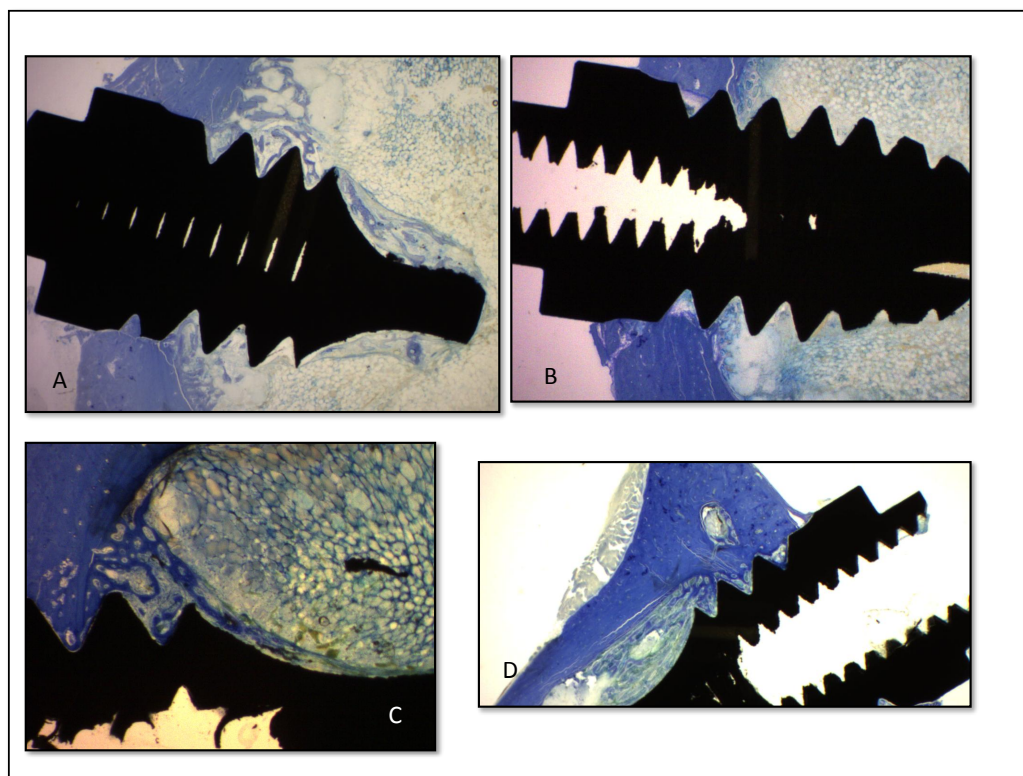


Fig. 34 : Comparativa de los cuatro grupos de estudio. Tinción Azul de Toluidina.

- A) Grupo **CONTROL/SANOS**: Se aprecian características histológicas óseas habituales. Trabéculas de osteointegración que parten del endostio hacia el implante y cortical ósea compacta con osteonas en el hueso maduro.
- B) Grupo **CONTROL/OVX**: Se observa menor actividad ósea que en el grupo anterior. Mayor presencia de tejido osteoide. Menor número de trabéculas.
- C) Grupo **IGF-I/SANOS**: La imagen muestra actividad ósea pero con trabéculas poco densas, más cortas y delgadas que en el grupo control/sanos.
- D) Grupo **IGF-I/OVX**: Hay escasa actividad neoformadora. Las trabéculas de en este grupo son cortas y delgadas y no llegan a contactar con el implante.

6.3.2 Análisis morfométrico

Para el estudio morfométrico se analizaron los cortes histológicos mediante un sistema avanzado integral de análisis de imagen, el MIP-45, con el que se obtuvieron los datos necesarios para la obtención del valor de referencia, el BIC.

Para el análisis estadístico de los datos se ha utilizado el programa estadístico SPSS.22 y se ha aplicado un análisis de la varianza con dos factores tomando como variable dependiente el valor del BIC y como factores la

ovariectomía (OVX), y el factor de crecimiento (IGF-I). Debido al tamaño muestral se ha fijado la significación en un valor de $p < 0,10$.

Lo primero que se ha analizado es la influencia del factor tibia derecha o izquierda en el resultado. Se aplicó la prueba T para muestras pareadas para comparar los resultados de la tibia derecha e izquierda no observándose diferencias significativas por lo que para el resto de valoraciones se usaron conjuntamente.

En la siguiente tabla se recogen los datos del BIC para los distintos grupos de estudio, se muestran los datos en porcentajes y con su desviación estándar. (Tabla 10).

Estadísticos descriptivos				
Variable dependiente: BIC				
OVARIECTOMÍA	FACTOR DE CRECIMIENTO	Media BIC (%)	Desviación estándar	N
SANOS	IGF-1	23,050	6,4351	8
	Sin factor	30,657	7,9001	6
	Total	26,310	7,8464	14
OVX	IGF-1	19,610	11,4492	10
	Sin factor	21,883	10,1586	6
	Total	20,463	10,6931	16
Total	IGF-1	21,139	9,4627	18
	Sin factor	26,270	9,8118	12
	Total	23,192	9,7747	30

Tabla 10 : Valores de BIC en % en los distintos grupos de estudio.

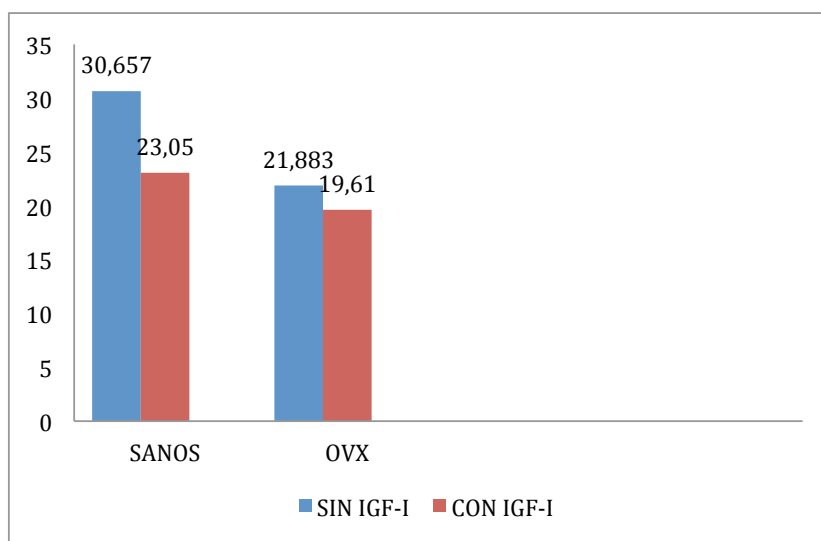


Fig. 35: Gráfico representativo del BIC en los distintos grupos.

Los datos recogidos en la tabla 11, muestran que el efecto del factor ovariectomía es significativo sobre el BIC para un $p < 0,10$, con un $p = 0,094$, y que el efecto del factor IGF-I y la interacción entre ambos factores no son significativos sobre el BIC con un $p > 0,10$.

La tabla 11 muestra los resultados comentados. (Tabla 11)

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: BIC

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	473,095	3	157,698	1,784	,175
Interceptación	16232,562	1	16232,562	183,684	,000
Ovariectomía	267,161	1	267,161	3,023	,094
Factor crec.	174,848	1	174,848	1,979	,171
Ovariectomía * Factor crec.	50,961	1	50,961	,577	,454
Error	2297,682	26	88,372		
Total	18906,159	30			
Total corregido	2770,777	29			

Tabla 11: Pruebas de efectos inter-sujetos

La siguiente figura muestra la representación gráfica de los resultados, sobre la que se puede realizar un análisis descriptivo de los datos obtenidos. (Fig. 36)

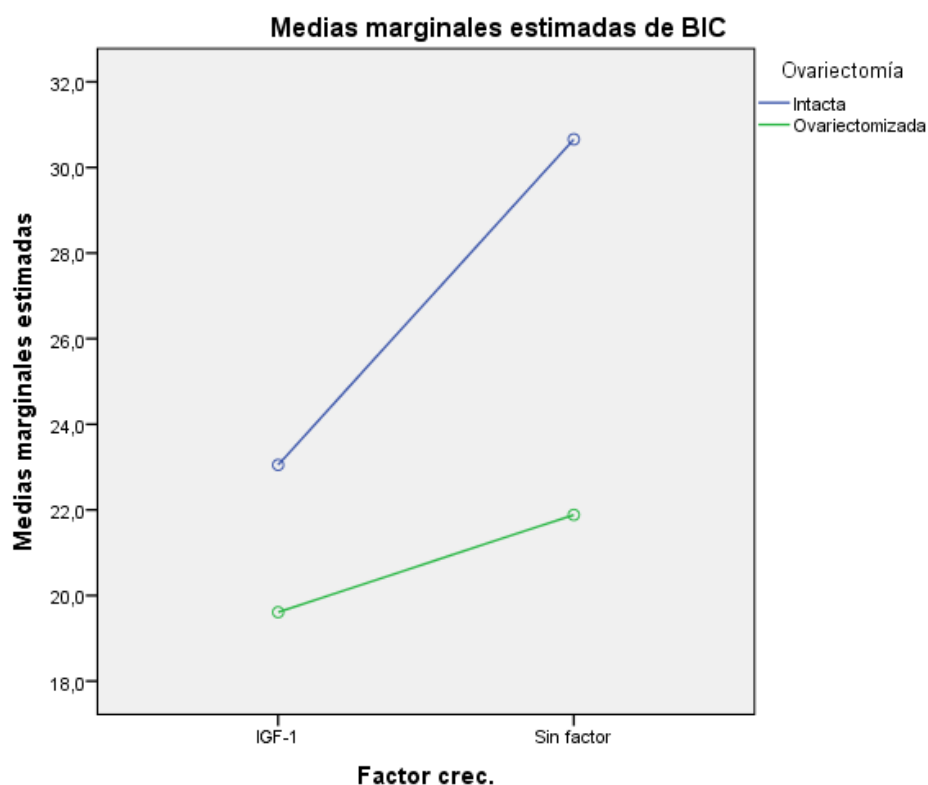


Fig. 36: Representación gráfica de los resultados

Dentro del análisis estadístico descriptivo se observa valores menores de BIC y por tanto menor osteointegración en el grupo de animales ovariectomizados (OVX), que en el grupo de animales intactos (SANOS).

Asimismo, se aprecian, en ambos grupos, valores de BIC más altos en ausencia de factor de crecimiento, especialmente en el caso de animales no ovariectomizados en los que la presencia IGF-I da lugar a valores de BIC más bajos.

Profundizando en el estudio se realizan las pruebas T para comparación de dos medias y se obtienen los resultados recogidos en las siguientes tablas. (*Tablas 12-19*)

1. Fijando el factor ovariectomía obtenemos:

a) Para animales SANOS:

Estadísticas de grupo					
	Factor cres.	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
BIC	IGF-1	8	23,050	6,4351	2,2752
	Sin factor	6	30,657	7,9001	3,2252

Tabla 12: Estadística de grupos: animales SANOS

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
BIC	Se asumen varianzas iguales	1,853	,198	-1,989	12	,070	-7,6073	3,8250	-15,9412	,7266
	No se asumen varianzas iguales			-1,927	9,529	,084	-7,6073	3,9469	-16,4609	1,2463

Tabla 13: Pruebas de muestra independientes: animales sanos.

El valor del BIC disminuye con la aplicación de IGF-I en los animales sanos de forma significativa para un $p < 0,10$ ($p = 0,07$).

b) Para animales OVX:

Estadísticas de grupo

	Factor crec.	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
BIC	IGF-1	10	19,610	11,4492	3,6206
	Sin factor	6	21,883	10,1586	4,1472

Tabla 14: Estadística de grupos: animales OVX

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
BIC	Se asumen varianzas iguales	,112	,743	-,400	14	,695	-2,2732	5,6833	-14,4626	9,9163
	No se asumen varianzas iguales			-,413	11,738	,687	-2,2732	5,5053	-14,2979	9,7516

Tabla 15: Pruebas de muestra independientes: animales OVX.

En los animales ovariectomizados la aplicación de factor de crecimiento no modifica la osteointegración. Se obtienen valores de BIC similares en presencia o ausencia de IGF-I con un $p > 0,10$.

2. Fijando el factor de crecimiento:

a) En los animales en los que se ha aplicado IGF-I

Estadísticas de grupo

	Ovariectomía	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
BIC	Sanos	8	23,050	6,4351	2,2752
	Ovariectomizada	10	19,610	11,4492	3,6206

Tabla 16: Estadística de grupos: animales con IGF-I

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
BIC	Se asumen varianzas iguales	3,196	,093	,757	16	,460	3,4396	4,5461	-6,1976	13,0768
	No se asumen varianzas iguales			,804	14,587	,434	3,4396	4,2761	-5,6972	12,5764

Tabla 17: Pruebas de muestra independientes: animales con IGF-I.

En cuanto a los efectos sobre el BIC de la aplicación de IGF-I, los datos que se obtienen indican que la aplicación local en el lecho quirúrgico de 4µg de IGF-I, no produce diferencias significativas ($P>0,10$) en la osteointegración de los implantes en animales SANOS frente a los ovariectomizados.

b) Cuando no se aplica factor de crecimiento (IGF-I):

Estadísticas de grupo

	Ovariectomía	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
BIC	Sanos	6	30,657	7,9001	3,2252
	Ovariectomizada	6	21,883	10,1586	4,1472

Tabla 18: Estadística de grupos: animales sin IGF-I

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
BIC	Se asumen varianzas iguales	,423	,530	1,670	10	,126	8,7737	5,2537	-2,9323	20,4797
	No se asumen varianzas iguales			1,670	9,428	,128	8,7737	5,2537	-3,0293	20,5767

Tabla 19: Pruebas de muestra independientes: animales sin IGF-I.

Cuando no se aplica IGF-I, los valores de BIC en animales SANOS frente a los ovariectomizados (OVX) presenta diferencias no significativas ($p= 0,12$) para $p<0,10$ (30,66 en SANOS frente a 21,88 en OVX) pero muestra una fuerte tendencia, lo que indica que si el tamaño muestral hubiera sido mayor se podría obtener mayor significación estadística.

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1 Modelo de experimentación animal

A la hora de realizar un trabajo de investigación animal, todos los autores coinciden en que es primordial elegir un modelo de experimentación adecuado, que permita desarrollar el procedimiento en cuestión y obtener la información de manera que resulte útil y apropiada.

La elección del modelo debe realizarse siguiendo criterios científicos, éticos y prácticos. El modelo debe tener capacidad para reflejar la biología humana o la enfermedad y adaptarse a un entorno clínico adecuado para el producto que está siendo probado.⁽⁸³⁾

El contar con un modelo de experimentación animal óptimo favorece la investigación y permite eliminar las trabas y limitaciones del estudio en humanos.⁽⁸²⁾

Para profundizar en el conocimiento de las características metabólicas del hueso osteoporótico, su respuesta regeneradora ante la colocación de implantes y su capacidad osteointegradora, se buscan modelos animales a los que se les induce, por uno u otro método, la osteoporosis para reproducir condiciones similares a las que se presentan en los pacientes osteoporóticos y poder así, estudiar, comprender y mejorar las condiciones de todos estos procesos dando como resultado un mayor éxito clínico.

Para establecer el modelo de osteoporosis experimental, distintos autores han utilizado gran variedad de animales y diversas técnicas para inducir la

osteoporosis, así como diferentes métodos de análisis de los distintos parámetros estudiados.

En este trabajo, se han utilizado conejas de la raza Nueva Zelanda como modelo osteoporótico de experimentación animal. La inducción de la osteoporosis, y su demostración mediante densitometrías *in vivo*, que constituyen la primera parte del estudio, ha sido realizada dentro de un grupo de trabajo, en conjunto con otros investigadores, siendo la obtención del modelo experimental un punto de partida común de varios estudios. De este modo, una vez inducida la osteoporosis, los animales se han distribuido en dos grupos, dando lugar a dos vías de investigación en las que se busca la mejoría de la osteointegración en animales osteoporóticos. Por un lado se realizó un estudio en el que se valoró la osteointegración tras la aplicación local de hormona de crecimiento (GH) y cuyos resultados fueron incluidos en una tesis doctoral y por otro, se ha desarrollado la presente investigación, en la que se analiza la osteointegración en animales sanos y osteoporóticos y el efecto de la aplicación local de IGF-I, en el lecho quirúrgico, antes de la colocación de los implantes en las tibias de los animales. De este modo, al realizar la primera parte de la investigación en conjunto, se ha conseguido rentabilizar el número de animales de experimentación empleados y por tanto, sacrificados, obteniendo el máximo provecho de los mismos. Este protocolo de inducción de la osteoporosis ha sido publicado en 2011.⁽⁹⁴⁾

La inducción de la osteoporosis en conejas de la raza Nueva Zelanda, se ha conseguido mediante ovariectomía y posterior dieta hipocálcica durante 6 semanas (0,07% de calcio frente al 0,45% de la dieta normal). Los resultados obtenidos mediante densitometrías *in vivo* antes y después de la ovariectomía y la

dieta confirman que se produce una disminución significativa de la densidad mineral ósea ($0,33 \pm 0,023$ mg/cm² inicial frente a $0,30 \pm 0,023$ mg/cm² final en columna y $0,71 \pm 0,039$ mg/cm² frente a $0,67 \pm 0,047$ mg/cm² en calota; $p < 0,05$ y $0,33 \pm 0,019$ mg/cm² frente a $0,32 \pm 0,031$ mg/cm² en tibia, $p = 0,10$).

Nuestros datos son comparables a los de Mori y colegas⁽⁹⁵⁾ de 1997, Wang et al, en 2006.⁽¹⁰⁵⁾ que obtienen un descenso de la DMO del 12% en un modelo de osteoporosis experimental desarrollado sobre conejas ovariectomizadas y sometidas a una dieta hipocálcica del 0,15% de calcio durante un mes. En nuestro trabajo se consigue una disminución del 4% al 10% según la localización con una concentración de calcio del 0,07% a las siete semanas. Por otro lado, Wang et al, en 2006⁽¹⁰⁵⁾ consiguen una disminución del 6% de la DMO en fémur de conejas ovariectomizadas sometidas a dieta normal en 6 meses.

En función del método utilizado por el investigador para inducir la osteoporosis, los modelos se pueden clasificar en dos grupos. Unos autores se basan en favorecer la reabsorción ósea mediante ovariectomía, inmovilización, dieta hipocálcica o administración de hormonas.^(88,86,89,96,97,) y otros en disminuir la capacidad formativa del hueso como en el caso de la utilización de animales viejos, uso de corticoides o inmovilización.⁽⁹⁸⁾

En la búsqueda del modelo animal osteoporótico ideal, la ovariectomía y la administración de corticoides en conejos son los principales tratamientos empleados. Hay autores que se basan en la ovariectomía sola^(59, 97,99), otros la consideran insuficiente y la complementan con la administración de corticoides para conseguir una disminución marcada de la densidad mineral ósea.^(82,95,100,98,101)

Castañeda et al, 2008⁽¹⁰¹⁾ también describen la inducción de la osteoporosis mediante la aplicación de glucocorticoides exclusivamente (metilprednisolona 1,5 mg/Kg/día durante 4 semanas.) En el estudio de Baofeng et al, 2010⁽¹⁰⁰⁾ además de la DMO, medida mediante DXA, constatan la osteoporosis con el análisis de la microarquitectura ósea y las propiedades mecánicas del hueso, valoradas con micro-tomografía computarizada. La medida de la DMO se realiza al inicio y a las 6 y a las 10 semanas, en este momento (tras 10 semanas), la DMO disminuye un 36% en el grupo OVX más metilprednisolona.

En nuestro trabajo se utiliza la dieta hipocálcica como coadyuvante de la ovariectomía. Otros autores también establecen una relación entre la pérdida de función ovárica y la dieta hipocálcica con la variación de la DMO. Moriya et al, 1998⁽⁸⁶⁾ observan disminución de la DMO en ratas sometidas a dieta baja en calcio y Norris et al, 2001⁽⁸⁸⁾ en columna lumbar de conejos.

Existen múltiples estudios que tratan de establecer la relación entre la pérdida de función ovárica y cambios en las distintas variables óseas. Cao et al, 2001,⁽⁵⁹⁾ evalúan la asociación entre la pérdida de función ovárica y la disminución de la densidad mineral ósea, utilizando la tomografía computarizada cuantitativa periférica, en la mandíbula de conejas ovariectomizadas, obteniendo valores significativos en la densidad mineral ósea total y en la densidad mineral ósea del hueso trabecular, 12 semanas tras la ovariectomía, sin embargo a las 4 semanas no obtienen cambios significativos ni a nivel trabecular, ni en la BMD total. En nuestro trabajo el tiempo transcurrido entre la ovariectomía y el sacrificio del animal es sensiblemente inferior a las doce semanas (7 semanas), similar a lo descrito en el trabajo de Castañeda et al, 2006⁽⁹⁸⁾ en el que pasan 6 semanas entre la

ovariectomía y la medición de densidad mineral ósea previa al sacrificio. En este caso los animales, dos semanas después de la cirugía, reciben una inyección intramuscular diaria de metilprednisolona durante las siguientes 4 semanas tras la ovariectomía. (1mg/Kg/día).

El modelo osteoporótico más empleado a lo largo de la historia es la rata ovariectomizada.^(69,85,86,87,102) Uno de los pioneros en el desarrollo de un modelo osteoporótico experimental mediante ovariectomía fue Saville en su trabajo publicado en 1969 realizado sobre ratas.⁽¹⁰³⁾ A pesar de que las ratas ovariectomizadas muestran la mayoría de las características de la osteoporosis postmenopáusica⁽⁸²⁾ y que los estudios en roedores son muy útiles por la información que nos dan de una manera rentable,⁽⁸³⁾ no son los animales ideales para el estudio de la fisiología del esqueleto adulto humano ya que las características esqueléticas y la biología ósea de los roedores son poco parecidas a las de los humanos, ya que no experimentan una menopausia natural, no cesa el crecimiento y no presentan sistemas de Havers.^(83,97)

Frente a los roedores, otros autores emplean los conejos como animal experimental,^(88,59,94,100,97,98) por considerarlo más apropiado ya que su fisiología ósea es más parecida a la humana, presentando un remodelado haversiano activo y un periodo de desarrollo rápido, alcanzando la madurez esquelética aproximadamente a los 6 meses de vida, permitiendo así, la obtención de resultados en un corto periodo de tiempo. Además tienen un tamaño más apropiado que el de las ratas para el estudio de implantes.

Además de la similitud de las características fisiológicas óseas del conejo con el humano, el hecho de ser un animal de fácil disponibilidad y manejo, el poder

contar con cepas genéticamente homogéneas y su capacidad de adaptación a la manipulación experimental hacen de los conejos un modelo animal de estudio adecuado. Por su tamaño reducido, no se pueden utilizar para valorar prótesis ortopédicas pero sí para el estudio de implantes dentales en tibia, fémur o mandíbula.⁽⁸²⁾

Pese a que todos los modelos tienen algunas diferencias en la fisiología ósea parece que el conejo es especialmente útil como modelo experimental aplicable a humanos, especialmente como modelo osteoporótico ya que los efectos de la ovariectomía son muy similares a los que ocurren tras la menopausia en humanos.^(82,59,98) Es un animal que ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la osteointegración de implantes dentales.^(59,82)

Otros animales utilizados como modelo experimental por su similitud con los humanos son los minicerdos, microcerdos o los monos, pero al igual que ocurre con otros animales grandes, como el perro o el gato, su precio, su disponibilidad limitada, su complicado manejo y su falta de aceptación social dificulta su uso.⁽⁸²⁾

Un modelo relativamente nuevo para el estudio de la osteoporosis postmenopáusica es el hurón. Presenta sistema haversiano y tras la ovariectomía se aprecia una pérdida ósea en la tibia proximal, aunque es demasiado pequeño para el estudio del anclaje de implantes en hueso osteopénico.⁽⁸²⁾

7.2 Determinación de la densidad mineral ósea

En este estudio, la determinación de la densidad mineral ósea de los animales *in vivo* se realiza mediante el Norland® XR-26, un densitómetro de rayos X de energía dual (DEXA). Este sistema ha sido utilizado en múltiples estudios

demostrando ser una técnica precisa, efectiva y fiable para evaluar la DMO y la CMO sobre pequeños mamíferos.^(43,67,94,95,101,98,100,97) Su precisión es superior a la de otros métodos no invasivos como la radiación X simple, la radiación γ simple⁽⁶⁴⁾ o doble,⁽⁶⁶⁾ o el ultrasonido cuantitativo.^(65,69) Además disminuye el tiempo de rastreo, la radiación para el paciente y el coste de la exploración.

Otros autores también emplean el DEXA como sistema de medida de la densidad mineral ósea en sus estudios sobre pacientes osteoporóticos tratando de evaluar el efecto de determinados fármacos.^(80, 77, 104, 80)

En la bibliografía se describen distintos densitómetros, basados en el sistema DEXA, para realizar las mediciones como el Hologic QDR-1000/W^(98,101), el Lunar DPX-IQ,⁽¹⁰⁰⁾ Lunar Prodigy Advance.⁽⁹⁷⁾ En este trabajo se ha empleado el Norland X-26® también utilizado por otros autores como Wang et al. 2006.⁽¹⁰⁵⁾

Con los datos obtenidos en el presente estudio se evidencia que se puede establecer un modelo de experimentación animal osteoporótico sometiendo a las conejas blancas de la raza Nueva Zelanda a ovariectomía y posterior dieta hipocálcica (0,07%) durante seis semanas, consiguiendo una disminución significativa de la densidad mineral ósea en columna vertebral ($0,33 \text{ mg/cm}^2 \pm 0,02$ frente a $0,30 \text{ mg/cm}^2 \pm 0,02$, $p < 0,05$) y calota ($0,71 \text{ mg/cm}^2 \pm 0,04$ frente a $0,67 \text{ mg/cm}^2 \pm 0,05$, $p < 0,05$) y una fuerte tendencia en tibia ($0,33 \text{ mg/cm}^2 \pm 0,02$ frente a $0,32 \text{ mg/cm}^2 \pm 0,03$, $p = 0,10$) coincidiendo con otros trabajos como el de Lugero et al,⁽⁹⁹⁾ que no demuestran pérdida de masa ósea en tibia pero sí en vértebra, donde la disminución de masa ósea fue de un 11%. por lo que estas localizaciones anatómicas pueden considerarse válidas para registrar las

variaciones de la densidad mineral ósea en modelos experimentales osteoporóticos. Por su parte Wang et al, ⁽¹⁰⁵⁾ demuestra la disminución de la densidad mineral ósea en fémur de conejas ovariectomizadas sometidas a dieta normal, ($0,34 \pm 0,12 \text{ mg/cm}^2$ inicial frente a $0,32 \pm 0,07 \text{ mg/cm}^2$ tras seis meses de la ovariectomía. Otros autores centran sus mediciones de densidad y contenido mineral óseo en columna lumbar, siendo esta una localización muy frecuente^(100,97,98), rodilla total y hueso subcondral y cortical de la metáfisis de tibia.

Otros métodos radiológicos empleados para el estudio del hueso son la tomografía computarizada, la tomografía cuantitativa periférica, la micro-tomografía computarizada, que permiten un estudio volumétrico, y la discriminación entre el hueso cortical y el trabecular. Además mide densidad real en el hueso. Requiere mayor radiación y es más costoso. ^(68,63, 106)

Cao et al, 2001⁽⁵⁹⁾ en conejas ovariectomizadas utiliza la tomografía computarizada periférica, encontrando alteraciones óseas equiparables a las que aparecen asociadas a la pérdida de función ovárica en humanos. Por su parte, Kuroda et al,⁽⁸⁹⁾ comparan en mandíbulas de ratas la tomografía con la técnica DEXA. Otros autores emplean la micro-tomografía computarizada, como Dai et al, 2015, ⁽⁹⁷⁾ en conejas y Altman et al, 2014⁽¹⁰⁷⁾ en ratas, Bajaj et al, 2014⁽¹⁰⁸⁾ en perros. O los ultrasonidos que ofrecen información adicional sobre la estructura, elasticidad y fortaleza ósea como García-Martín y colegas en 2011⁽⁸¹⁾, Rico 1991⁽⁶⁵⁾ y Giavaresi y colaboradores en 2000⁽⁶⁹⁾ este último trabajo compara los ultrasonidos con la radiación dual, llegando a la conclusión de que ambas técnicas son precisas y válidas para el estudio de la densidad mineral en animales de experimentación.

Según Peric et al, 2015,⁽⁸³⁾ los rayos X con o sin la tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT) son el método de elección para los estudios *in vivo*, por su gran correlación con los test mecánicos de resistencia ósea.^(100,97,109)

Una vez establecido el modelo animal de experimentación, se organizaron cuatro grupos de estudio: conejas sanas, ovariectomizadas, sanas con IGF-I y ovariectomizadas con IGF-I, tras distribuir aleatoriamente a los animales. Posteriormente, se colocaron los implantes dentales en la cara interna de las tibias de las conejas, para evaluar la osteointegración de los mismos bajo condiciones tanto de normalidad en el metabolismo óseo como de osteoporosis y estudiar los efectos de la aplicación local de IGF-I, tanto en el hueso normal como en el osteoporótico.

7.3 Características de los implantes

En el proceso de integración de los implantes además de las características del hueso va a influir la morfología del implante y las características de su superficie. En nuestro trabajo, se han utilizado implantes roscados, manufacturados por una casa argentina, con las características de los implantes 3i®. En la actualidad el implante roscado es el más empleado ya que han demostrado mejor comportamiento que los cilíndricos impactados. Algunos autores como Lugero et al. 2000⁽⁹⁹⁾ concluyen que la cantidad de hueso formado alrededor del implante es mayor en los roscados que en los cilíndricos. La superficie de los implantes también condiciona la integración de los mismos, es por ello que los investigadores tratan de encontrar sustancias de recubrimiento que favorezcan la unión del implante al hueso. Se han descrito varias

modificaciones de la superficie de los implantes mediante métodos aditivos (recubrimiento de HA u otros fosfatos de calcio, spray de plasma de titanio, depósito de iones) o métodos sustractivos (electropulido, arenado, grabado ácido, oxidación) o combinación de estos métodos. Pan et al. 2000.⁽¹¹³⁾ utiliza implantes con recubrimiento de hidroxiapatita (HA). Li et al. 2013⁽¹⁰⁶⁾ compara el recubrimiento con HA con implantes recubiertos de una combinación de hidroxiapatita y zinc. Schlee et al, 2014⁽¹¹⁰⁾ estudia el comportamiento de los implantes de tantalio obteniendo resultados satisfactorios y concluyendo que son clínicamente efectivos. Wennerberg et al, 2009⁽¹¹¹⁾ concluyen que la superficie lisa y mínimamente rugosa tiene menor respuesta ósea que la rugosa. Vandamme et al, 2008⁽¹¹²⁾ obtienen mayor integración en implantes rugosos.

Recientemente, Ogawa et al, 2014⁽¹¹⁵⁾ valoran la influencia de la aplicación de vibración de alta frecuencia a los implantes para favorecer la integración. Valoran el BIC y el volumen óseo peri-implantario respecto al volumen tisular (cantidad de hueso en un área determinada), obteniendo resultados positivos.

Todo lo expuesto, pone de manifiesto el interés de la comunidad científica por encontrar métodos que favorezcan la osteointegración tanto en sujetos sanos como en el caso de sujetos con una respuesta ósea alterada como el caso de los pacientes osteoporóticos.

7.4 ¿Influye la osteoporosis en la osteointegración de los implantes?

Tras la colocación de los implantes, su comportamiento biológico va a depender principalmente de sus características superficiales y de la cantidad y

calidad del tejido óseo. La osteointegración se relaciona con una actividad celular óptima y un incremento en la mineralización de la matriz ósea periimplantaria. Comienza con una fase de reabsorción alrededor del implante seguido por una fase de formación.

Diversos autores han estudiado las características de la osteointegración de los implantes en el hueso osteoporótico, Mori et al, 1997⁽⁹⁵⁾ estudian la interfase hueso-implante en conejas ovariectomizadas sometidas a dieta hipocálcica y Lugero et al, 2000⁽⁹⁹⁾ estudian la osteointegración de dos tipos de implantes (roscados y cilíndricos) en conejas osteoporóticas. Los resultados de ambos trabajos coinciden en que la formación ósea es mayor en el grupo control pero que, aunque la osteoporosis afecta a la curación del tejido óseo alrededor del implante, prolongado el proceso, la osteointegración puede lograrse en el hueso osteoporótico. Otros autores como Pan et al. 2000⁽¹¹³⁾ y Li et al. 2013⁽¹⁰⁶⁾ realizan sus estudios en ratas ovariectomizadas.

Para tratar de mejorar la fisiología del tejido óseo alterado en pacientes con osteoporosis, los investigadores buscan, en sus estudios distintas sustancias que mejoren las características del hueso osteoporótico. Miller et al, 1997⁽¹¹⁶⁾, aplican PTH en ratas, demostrando un aumento en la formación ósea en este modelo animal osteoporóticos. Por su parte Suliman y colaboradores en 2001⁽¹¹⁷⁾ miden los niveles de IGF-I y GH en el fémur de ratas ovariectomizadas y el efecto de la aplicación de estrógenos y progesterona en dichos niveles y en la densidad ósea, concluyendo que la ovariectomía disminuye los niveles de GH pero no influye en los niveles de IGF-I, coincidiendo con los resultados de Fritton et al. 2010⁽¹¹⁸⁾ y que el tratamiento con estradiol aumenta los niveles de GH y de IGF-I mientras que el

tratamiento con progesterona restaura el nivel de GH y aumenta el de IGF-I. En cuanto a la densidad ósea, la ovariectomía la disminuye, la aplicación de estradiol la restaura y la progesterona la restaura parcialmente.

7.4.1 Resultados histológicos

En nuestro trabajo el análisis histológico de los animales osteoporóticos evidencia, como se observa en las figuras 25 y 26 descritas en los resultados, una disminución de trabéculas óseas tanto en tamaño como en cantidad, y se aprecia actividad ósea pero con mayor contenido osteoide, coincidiendo con los resultados de Lugero et al, 2000⁽⁹⁹⁾ que observan un volumen trabecular y una aposición mineral significativamente mayor en los controles que en los osteoporóticos, que a su vez muestran mayor perímetro de tejido osteoide que el grupo control.

Nuestros resultados también son coincidentes con los de Pan et al, 2000⁽¹¹³⁾ que mostraron una disminución de la densidad trabecular alrededor del implante en ratas osteoporóticas, no observando cambios en la cortical.

7.4.2 Resultados morfométricos

Junto a estos cambios histológicos, nuestros resultados muestran que el BIC disminuye significativamente, para un $p < 0,10$ en el grupo de animales ovariectomizados ($26,310 \pm 7,846$ en SANOS frente a $20,463 \pm 10,693$ en OVX con un $p = 0,09$).

7.5 ¿Influye la aplicación de 4 µg de IGF-I en el lecho quirúrgico en la integración de los implantes?

Este trabajo pretende estudiar la osteointegración de implantes, a través del valor de BIC, en conejas sanas y con osteoporosis inducida y su modificación con la aplicación local de 4 µg de IGF-I en el lecho quirúrgico, en el momento de la inserción del implante.

Los resultados obtenidos muestran que dicha aplicación no mejora la osteointegración de los implantes. Al considerar el BIC en el animal osteoporótico, la aplicación de IGF-I no modifica la osteointegración. Sin embargo en el caso de los animales no ovariectomizados, se produce una disminución significativa, para $p < 0,10$, del BIC en presencia de IGF-I, con un $p = 0,07$.

En ausencia del factor de crecimiento las diferencias en el BIC de ambos grupos se acercan a la significación, con un $p = 0,12$ para $p < 0,10$. Se obtienen cerca de diez puntos de diferencia en ambos valores, lo que nos hace pensar que en muestras más amplias podrían llegar a la significación estadística.

Es bien conocido y se ha descrito en la introducción, los efectos anabólicos del IGF-I, favoreciendo el crecimiento y desarrollo tisular, su actividad proliferativa, antioxidante, antiedad, sus acciones en el metabolismo óseo, tanto como mediador de las funciones de la GH, como por sus propias funciones. En la actualidad se conoce el importante papel del IGF-I en el crecimiento, desarrollo y en el metabolismo, tanto a través de su efecto endocrino, en el caso IGF-I sérico, regulado por la GH, como del efecto autocrino/paracrino de IGF-I local. Ambos, GH e IGF-I están altamente relacionados formando el llamado eje GH/IGF-I que se

considera fundamental en la regulación del crecimiento esquelético y la mineralización, Yakar et al. (2010)⁽¹¹⁹⁾

En líneas generales, a nivel óseo, el IGF-I tiene un doble papel sobre los osteoblastos, en primer lugar estimula la proliferación y diferenciación de preosteoblastos y posteriormente actúa sobre el osteoblasto diferenciado estimulándolo y favoreciendo la formación y mineralización de la matriz y la formación de colágeno.⁽²⁵⁾

En experimentación animal se ha demostrado su papel anabólico en el hueso ya que se observa una disminución de la DMO si se altera la producción o función de IGF-I y aumento de masa ósea si se aumenta la exposición a IGF-I.^(35,40) También Abbaspour et al, 2007⁽¹⁰⁹⁾ valora los efectos de la infusión local continua de IGF-I en la epífisis de conejos jóvenes observando aumento del volumen trabecular óseo. Además observan un incremento de la longitud de la tibia y un aumento del número de trabéculas óseas y de la proliferación de condrocitos.

Zhang et al, en 2002⁽³⁸⁾ y Fowlkes et al, en 2006,⁽²⁶⁾ demuestran la influencia del IGF-I en la actividad del osteoblasto trabajando con ratones.

En cuanto al papel de la IGF-I en la reabsorción ósea existe mucha controversia.^(25,19,42) Para algunos autores aumenta el número de osteoclastos y su función.^(13,19) Otros hablan de un efecto indirecto sobre el osteoclasto a través de factores producidos por los osteoblastos⁽²⁵⁾ y otros piensan que no tiene efectos sobre la reabsorción ósea.⁽¹⁸⁾ Se ha observado que a dosis bajas, estimula de forma independiente la formación ósea sin inducir reabsorción⁽⁴²⁾. Algunos autores hablan de incremento en la formación ósea y disminución de la reabsorción por inhibición de la osteoclastogénesis a través de la disminución de RANKL.^(43,120) Mientras que otros trabajos concluyen en que la regulación de la remodelación

ósea por el IGF-I está mediado por el sistema OPG/RANKL, disminuyendo la OPG y aumentando el RANKL y por tanto estimulando la reabsorción ósea.⁽¹²¹⁾

Este papel eminentemente anabólico del IGF-I y los numerosos estudios que sugieren la capacidad regenerativa de determinados factores de crecimiento, incluido el IGF-I, es lo que nos ha llevado a estudiar su posible efecto favorecedor de la osteointegración tras su aplicación local en el lecho implantario previamente a la inserción del implante, tanto en animales sanos como en animales osteoporóticos.

A este respecto existen trabajos como el de Lynch et al, 1991⁽⁹²⁾ que aplican una combinación de PDGF-IGF-I a los implantes mediante un gel de metilcelulosa que contiene 4µg de ambos recombinantes, IGF-I y PDGF. Los implantes fueron colocados en perros y los resultados, en el día 7, muestran un 19,6% de superficie de implante en contacto con el nuevo hueso en el grupo experimental frente al 10,9% del grupo de implantes no tratados o el 8,5% en el grupo tratado con gel sin factor de crecimiento, y en el día 21, se observan menos diferencias. Hay un 27% de superficie de implante en contacto con hueso en el grupo tratado con PDGF-IGF-I, un 34,3% en el grupo tratado con gel sin factor y un 31% en el grupo no tratado. Respecto a la cantidad de nuevo hueso que rellena los espacios peri-implantarios, se observa un aumento, tanto en el día 7 como en el día 21, en el grupo tratado con factor de crecimiento. Esto indica que la combinación de los dos factores tiene un efecto favorecedor de la osteointegración en las fases tempranas de la curación.

La misma combinación de factores de crecimiento emplean Stefani et al, 2000⁽¹²²⁾ en este trabajo utilizan 5 µg/ml de PDGF+ IGF-I en un gel de metilcelulosa en el grupo experimental y el gel solo en el grupo control. Valoran la

integración a las 3, 8 y 12 semanas y muestran mayor BIC ($22,4 \pm 13,7\%$ del grupo con factores de crecimiento frente a $17,2 \pm 13,6\%$ del grupo control) a las tres semanas y mayor intensidad de hueso marcado a las tres semanas que a las doce semanas. Esto indica un efecto favorecedor de la osteointegración de la combinación de factores en la fase inicial de la regeneración ósea.

Un trabajo similar realizan Nociti et al, 2000⁽¹²³⁾ obteniendo resultados positivos de la osteointegración en el grupo experimental respecto al grupo control Reportan mayor BIC, mayor área ósea y mayor intensidad de hueso marcado a las 3 y 8 semanas tras la colocación de los implantes.

Ortolani et al, 2014⁽⁹³⁾ desarrollan su trabajo sobre conejos a los que se les colocan implantes en el fémur y se valora mediante análisis histológico e inmunohistoquímico, su osteointegración en función de la aplicación local de PDGF, IGF-I y PRP, observando efectos positivos, mayor regeneración ósea, mayor depósito de hueso nuevo, en la combinación de IGF-I y PDGF diluidas en una concentración de $4\mu\text{g}/\mu\text{L}$ frente a los valores obtenidos en los controles o en el grupo con PRP.

Por su parte Lamberg et al, 2006⁽¹²⁴⁾ valora el efecto de la liberación local, de TGF- β 1 junto a IGF-I en un revestimiento biodegradable de polímero sobre la fijación mecánica y la integración de implantes de titanio en perros, describiendo un incremento de 2 a 3 veces del crecimiento óseo, en el grupo experimental, y desaparición del tejido fibroso. Este mismo autor, en 2009, estudia el efecto de la aplicación local de TGF- β 1+ IGF-I en la fijación de implantes ortopédicos en perros y lo compara con el recubrimiento de hidroxiapatita obteniendo resultados similares en cuanto a la fijación mecánica. Además observan que el recubrimiento

de HA principalmente estimula el crecimiento óseo mientras que la liberación de factores de crecimiento favorece la curación del gap.⁽¹²⁵⁾ La hidroxiapatita *per se* también se ha utilizado como recubrimiento de implantes para favorecer la osteointegración.⁽¹¹³⁾

No se han encontrado estudios en los que se aplique IGF-I aislado con el fin de modificar la osteointegración de implantes, para poder corroborar nuestros resultados.

Se han empleado otros factores de crecimiento para mejorar la integración de implantes. El trabajo de Schmidmaier et al, 2002⁽¹¹⁴⁾ estudian los efectos de la aplicación local de proteínas morfogenéticas óseas, en concreto, BMP-2 como recubrimiento de implantes para acelerar el remodelado óseo y mejorar las fuerzas de unión del implante durante el tratamiento de fracturas óseas. El estudio se desarrolla en ratas y se evalúan los resultados mediante radiografías y estudio histológico e histomorfométrico a los 28 y 42 días demostrando mayor mineralización y menor cantidad de cartílago en el grupo experimental.

Asimismo, se ha estudiado la aplicación de GH tanto local como sistémica. El trabajo de Martín Monge en 2008⁽¹²⁶⁾, valora los efectos de la aplicación local de 2 UI de rhGH sobre la osteointegración de implantes colocados en tibias de conejas intactas y ovariectomizadas, obteniendo al igual que nosotros una disminución del BIC en animales no osteoporóticos en presencia de GH. Sin embargo, en los animales con osteoporosis, la aplicación del factor de crecimiento (GH) mejora la osteointegración, mientras que la aplicación de IGF-I en nuestro estudio no la modifica.

Tresguerres y colaboradores en 2002,⁽¹²⁷⁾ también aplican 4 UI de rhGH localmente sobre implantes en conejas osteoporóticas valorando sus efectos sobre el BIC y obteniendo un aumento en la osteointegración de los implantes.

En cuanto a la aplicación sistémica de GH, Stenport et al, 2001,⁽¹²⁸⁾ colocan implantes en tibias de conejas y administran dosis de 0,3 U/Kg/día de GH mediante una bomba subcutánea y valoran los efectos a las dos y ocho semanas, observando mayor estabilidad inicial y no encontrando cambios a nivel de valores de DEXA, ni del torque necesario para retirar los implantes, ni en los resultados histomorfométricos por lo que concluyen que los beneficios de la aplicación de la hormona de crecimiento se limitan a las etapas iniciales y no se prolongan en el tiempo.

En relación al análisis histológico, Mierisch et al, en 2002⁽³⁶⁾ han demostrado mediante estudio *in vitro*, que la aplicación de injertos de periostio tratados con IGF-I, estimula la condrogénesis por incremento de colágeno tipo II. Este aumento es dependiente de la dosis y del tiempo de aplicación. En el trabajo de Ortolani et al, 2014⁽⁹³⁾ la aplicación de PRP o de PDGF+IGF-I al 4º día produce una boina de tejido fibroblástico alrededor del implante colocado en fémur de conejo, mientras que en el grupo control aparece un depósito de fibroblastos discontinuos. El depósito comienza cerca del cuello bajo la cortical, bordeado por osteoblastos. Este depósito es matriz osteoide trabecular que no se une ni al implante ni al hueso cortical. Al 7º y 12º día el grupo tratado con PDGF+ IGF-I presenta una gran regeneración cerca del cuello adherido a la cortical, por formación ósea endostal, al igual que en nuestro trabajo, y se observan numerosas islas de cartílago dando lugar a osificación endocondral alrededor del implante. La

formación de tejido óseo es mayor en este grupo que en el control o el tratado con PRP.

Abbaspour et al, 2007⁽¹⁰⁹⁾ utilizan como método de medida la pQCT, para valorar los efectos de la infusión local continua de IGF-I en la epífisis de conejos jóvenes observando aumento del volumen trabecular óseo. Además observan un incremento de la longitud de la tibia y un aumento del número de trabéculas óseas y de la proliferación de condrocitos.

7.6 Mecanismo mediante el cual actúa IGF-I de forma local

El IGF-I es un factor activo a nivel de crecimiento óseo como demuestran gran número de estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*. Juega un papel esencial en el crecimiento longitudinal del hueso, por estimulación de la proliferación de condrocitos en la placa de crecimiento, y en la formación del hueso trabecular. Entre sus acciones biológicas se encuentran su capacidad para estimular la proliferación de osteoblastos, acelera su diferenciación y estimula la acción del osteoblasto ya diferenciado potenciando la síntesis de matriz ósea y su mineralización. Además, juega un papel importante en la supervivencia de las células óseas. Zhang et al, en 2002⁽³⁸⁾ demuestra *in vivo*, en ratones, la influencia del IGF-I en la actividad del osteoblasto. En cuanto a la reabsorción ósea, el papel del IGF-I no está tan claro, para algunos autores como Wang et al, en 2006⁽⁴²⁾ estimula la osteoclastogénesis, aunque otros como Sun et al, en 2013⁽⁴³⁾ admiten que interfiere en ella, disminuyendo los osteoclastos por inhibición de RANKL y aumento de OPG que compite con el RANKL por su receptor. Por otra parte juega un papel importante en la supervivencia de las células óseas.⁽³⁸⁾

En este trabajo el IGF-I aplicado localmente en el lecho implantario, parece no tener efecto positivo sobre la osteointegración en animales osteoporóticos, como plantea nuestra hipótesis de trabajo. Posiblemente, si el método de aplicación hubiera sido diferente, mediante aplicación continua, durante la primera semana de la colocación de los implantes, hubiéramos obtenido más diferencias en nuestros resultados.

Debido a que la vida media del IGF-I es de pocas horas, podemos pensar que la administración tópica de una gota de 4 µg de IGF-I en el lecho quirúrgico justo antes de la inserción del implante, no produce efecto porque a las tres horas de su administración desaparece. Este comportamiento difiere del de la GH, que mantiene su efecto durante varios días, siendo capaz de estimular no solo los osteoblastos, sino también los fibroblastos y condroblastos, ambos con receptores para GH, del callo óseo. Este hecho produce lo que Tresguerres y colaboradores en 2002⁽¹²⁷⁾ han denominado “efecto impulso”, es decir que una única dosis de 4 UI de rhGH, administrada localmente en el lecho óseo, justo antes de la inserción del implante, es capaz de estimular varias estirpes celulares implicadas en el proceso de regeneración, seguramente a través del estímulo de las células mesenquimales pluripotenciales que tienen receptores para GH.

En esto radica el diferente mecanismo de acción entre GH e IGF-I.

Tal vez, si la administración de IGF-I se hubiera realizado mediante una bomba de infusión continua o mediante encapsulación que permita una liberación sostenida, se hubieran obtenido mayores diferencias, como se recoge en los trabajos de Abbaspour et al, 2008⁽¹⁰⁹⁾ en conejos, que utilizan una bomba subcutánea para la administración de 150 µg/Kg/día durante 1, 2 y 3 semanas,

según el grupo de estudio y Luginbuehl et al, 2013⁽¹²⁹⁾ que comparan la aplicación local con el uso de sistemas de liberación controlada, mediante polímeros sintéticos, obteniendo con estos últimos resultados más favorables. Otros autores aplican el factor de crecimiento localmente pero unido a una sustancia transportadora, como los polímeros es el caso de Lamberg et al, en 2009⁽¹²⁴⁾ o el trabajo de Fowlkes et al, en 2006,⁽²⁶⁾ en el que estudian si la administración de IGF-I local y/o sistémica en ratones viejos, mejora la osteoblastogénesis y la formación de hueso nuevo. En este caso, la aplicación del factor de crecimiento también se realiza a través de una bomba de infusión (1 µg/7µL liberando 0,25 µg/hr±0,05 µL/día). El estudio se desarrolla durante 14 días. Sus resultados muestran un aumento en la formación ósea en el grupo experimental independientemente de la vía de administración. También Sun et al, en 2013⁽⁴³⁾ en su trabajo sobre ratas osteoporóticas, inyectan el IGF-I durante tres días a razón de 100 µg/Kg/día, y miden DMO mediante DEXA a las 4 y a las 6 semanas después de la inducción de la osteoporosis, obteniendo valores mayores para el grupo experimental, además registran una disminución significativa de los niveles de RANKL y aumento de OPG en los animales tratados con IGF-I. Por lo que concluyen que el IGF-I estimula la formación ósea por aumento del número y función de los osteoblastos y reduce la diferenciación de osteoclastos por lo que inhibe la reabsorción ósea.

La revisión bibliográfica de Lieberman y colaboradores en 2002 ⁽²²⁾ recoge el trabajo de Thaller et al, que también utilizan un sistema de liberación continua, mediante bomba, durante 14 días, en este caso para administración sistémica de IGF-I para valorar su papel en la estimulación de la formación de hueso intramembranoso, para la reparación de defectos en calota en ratas. Los resultados

de este estudio sugieren que IGF-I debe jugar un papel importante en la curación de los defectos que curan por osificación intramembranosa.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo se llega a las siguientes conclusiones:

1. Mediante la ovariectomía bilateral y dieta hipocálcica con el 0,07% de calcio se consigue una disminución estadísticamente significativa de la DMO en calota y columna cervical, mientras que en la tibia disminuye sin ser significativa, medida mediante densitometrías *in vivo*.
2. En el estudio histológico, se observa una menor cantidad de hueso, tanto cortical como trabecular en los animales con osteoporosis inducida, así como una mayor cantidad de tejido osteoide.
3. La administración local de 4 µg de IGF-I no induce cambios en la histología.
4. EL BIC disminuye de forma estadísticamente significativa en los animales con osteoporosis experimental.
5. La administración local de 4 µg de IGF-I en el lecho quirúrgico inmediatamente antes de la colocación del implante, no mejora el BIC en el animal con osteoporosis inducida.
6. Sorprendentemente, la administración local de 4 µg de IGF-I disminuye, de forma estadísticamente significativa, la osteointegración en animales sanos, sin osteoporosis.
7. Dentro de las limitaciones de este estudio experimental, la administración local de 4 µg de IGF-I no sirve para favorecer la osteointegración en animales con osteoporosis inducida y resulta contraproducente en animales sanos.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. Bibliografía

1. Finn Geneser. Histología sobre base moleculares. Buenos Aires; Madrid: Ed.Médica Panamericana; 2008.
2. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E47-51.
3. Gil Albarova J, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R, Melgosa Gil M. Materiales para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia genética en Cirugía Ortopédica y Traumatología Mapfre Medicina 2003;14:51-65.
4. Barba EJR. Marcadores de remodelado óseo y osteoporosis. Rev Mex Patol Clin 2011;58(3):113-37.
5. Bellido T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. Calcif Tissue Int 2014;94(1):25-34. Doi: 10.1007/s00223-013-9774-y.
6. Lau K-HW, Baylink DJ, Sheng MH-C. Osteocyte-Derived Insulin-Like Growth Factor I Is Not Essential for the Bone Repletion Response in Mice. PLoS ONE 2015;10(1): e0115897doi:10.1371/journal.pone.0115897.
7. Grinspoon SK, Baum H B.A., Peterson S, Klibanski A. Effects of rhIGF-I administration on bone turnover during short-term fasting. J. Clin. Invest 1995;96:900-6.
8. Neyro Bilbao JL, Cano Sánchez A, Palacios Gil-Antuñano S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. Rev Osteoporos Metab Miner 2011;3(2):105-12.
9. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E151-7.
10. Compston JE. Sex steroids and bone. Physiol Rev 2001;81:419-47.
11. Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF, Bunger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. APMIS 1995;103:140-6.
12. Romero CM, Manrique S, Rodríguez M . Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. Reumatol Clin 2012;8(2):149-52.
13. García García V, Corral 1, Bascones Martínez A. Plasma Rico en Plaquetas y su utilización en implantología dental. Av Períodon Implantol 2004;16(2):81-92.
14. Infante-Cossío P, Gutiérrez-Pérez J.L, Torres-Lagares D, García-Perla García A, González-Padilla J.D. Bone cavity augmentation in maxillofacial surgery using autologous material. Rev Esp Cir Oral y Maxilofac 2007;29(1):7-19.
15. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration . Eur Spine J 2001;10: S96-S101.
16. Goldberg P, Deister E, Gutiérrez AM, Sánchez P. Bases científicas de la implantología. Revista ADM 2003;60(3):110-14.
17. Solheim E. Growth factors in bone. International Orthopaedics 1998;22:410-16.

18. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth Factors and the Regulation of Bone Remodeling. *J Clin Invest* 1988;81:277-81.
19. Canalis E. Prospect - growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem* 2009;108(4):769-77.
20. Salata LA, Franke-Stenport V, Rasmusson L. Recent Outcomes and Perspectives of the Application of Bone Morphogenetic Proteins in Implant Dentistry. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2002;4(1):27-32.
21. Peñarrocha Diago M, Sanchis Bielsa JM, Martínez González JM. Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: aplicaciones en implantología oral. *Periodoncia* 2001;11(3):205-16.
22. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The Role of Growth Factors in the Repair of Bone. *The journal of bone & joint surgery* 2002; 84(6):1032-44.
23. Eingartner C, Coerper S, Fritz J, Gaissmaier C, Koveker G, Weise K. Growth factors in distraction osteogenesis. Immuno-histological pattern of TGF- β 1 and IGF-I in human callus induced by distraction osteogenesis. *International Orthopaedics* 1999;23:253-59.
24. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C. Superficies bioactivas en implantología: una nueva perspectiva. *Av Periodon Implantol* 2007;19 Suppl:43-50.
25. Mezquita Raya P, Muñoz Torres M. Importancia del IGF-I en el metabolismo óseo. *REEMO* 2003;12(6):117-9.
26. Fowlkes JL, Thrailkill KM, Liu L, Wahl EC, Bunn RC, Cockrell GE, et al. Effects of Systemic and Local Administration of Recombinant Human IGF-I (rhIGF-I) on De Novo Bone Formation in an Aged Mouse Model. *J Bone Miner Res* 2006;21(9):1359-66.
27. Lind M. Growth factors: Possible new clinical tools: A review, *Acta Orthopaedica Scandinavica* 1996;67(4):407-17.
28. Pombo M. Tratado de endocrinología pediátrica. 2 ed. Madrid: Ed. Díaz de Santos; 1997.
29. Scarth J. Modulation of the growth hormone-insulin-like growth factor (GH-IGF) axis by pharmaceutical, nutraceutical and environmental xenobiotics: an emerging role for xenobiotic-metabolizing enzymes and the transcription factors regulating their expression. A review. *Xenobiotica* 2006;36(2-3):119-218.
30. LeRoith D. Insulin-like Growth Factors and Cancer. NY: Humana Press; 2012.
31. Morán E, Polo A, Soto A, García G, Morales G, Martínez M, et al. El síndrome metabólico o el aumento de IGF-1 influyen en la aparición del cáncer de próstata? *Rev Int Grupos Invest Oncol* 2012;1(1):2-6.
32. Milinarsky A, Fischer S, Giadrosich V, Hernández MI, Torres MT. Bone mineral density in school age infants born preterm. *Rev Méd Chile* 2003;131:1289-94.
33. Lafita J. Physiology and bone physiopathology. *An Sist. Sanit. Navar* 2003;26(3):7-15.
34. Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulin-like Growth Factor I Mediates Selective Anabolic Effects of Parathyroid Hormone in Bone Cultures. *J Clin Invest* 1989;83:60-5.
35. Rosen CJ, Dimai HP, Vereault D, Donahue LR, Beamer WG, Farley J, et al. Circulating and Skeletal Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Concentrations in two inbred Strains of Mice with Different Bone Mineral Densities. *Bone* 1997;21(3):217-23.
36. Mierisch CM, Anderson PC, Balian G, Diduch DR. Treatment with Insulin-Like Growth Factor-1

- Increases Chondrogenesis by Periosteum In Vitro. *Connective Tissue Research* 2002;43:559–68.
37. Stabnov L, Kasukawa Y, Guo R, Amaar Y, Wergedal JE, Baylink DJ, et al. Effect of Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) Plus Alendronate on Bone Density During Puberty in IGF-1-deficient MIDI Mice. *Bone* 2002;30(6):909–16.
 38. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, et al. Osteoblast-specific Knockout of the Insulin-like Growth Factor (IGF) Receptor Gene Reveals an Essential Role of IGF Signaling in Bone Matrix Mineralization. *J Biol Chem* 2002;277(46):44005–12.
 39. Canalis E. Effect of Insulinlike Growth Factor I on DNA and Protein Synthesis in Cultured Rat Calvaria. *J Clin Invest* 1980;66:709–19.
 40. Cemborain A, Castilla- Cortázar I, García M, Muguerza B, Delgado G, Díaz-Sánchez M, et al. Effects of IGF-I treatment on osteopenia in rats with advanced liver cirrosis. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2000;56(2):91-9.
 41. Canalis E. Insulin-Like Growth Factors and Osteoporosis. *Bone* 1997;21(3):215-16.
 42. Wang Y, Nishida S, Elalieh HZ, Long RK, Halloran BP, Bikle DD. Role of IGF-I Signaling in Regulating Osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 2006;21:1350–58.
 43. Sun Hai-biao , Chen Jun-chang. Prevention of bone loss by injection of insulin-like growth factor-1 after sciatic neurectomy in rats. *Chin J Traumatol* 2013;16(3):158-62.
 44. Riikonen R, Makkonen I, Vanhala R, et al. Cerebrospinal fluid insulin-like growth factors IGF-1 and IGF-2 in infantile autism. *Dev Med Child Neurol* 2006;48:751-5.
 45. Locatelli V, Bianchi VE. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporsosis. *International Journal of Endocrinology* 2014;ID 235060, 1-25.
 46. Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2008; 19:399-428.
 47. Dao TTT, AndersonJD, Zarb GA. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants?. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8:137-44.
 48. Nordin BEC. The definition and diagnosis of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1987;40:57-8.
 49. Mazess RB. Bone density in diagnosis of osteoporosis: threshold and breakpoints. *Calcif Tissue Int* 1987;41:117-8.
 50. Pineda B, Serna E, Laguna-Fernández A, Noguera I, Panach L, Hermenegildo C, et al. Gene expression profile induced by ovariectomy in bone marrow of mice: A functional approach to identify new candidate genes associated to osteoporosis risk in women. *Bone* 2014;65:33–41.
 51. Garnerero P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone* 2014;66: 46–55.
 52. Hermoso de Mendoza MT. Classification of osteoporosis. Risk Factors. Clinical manifestations and differential diagnosis. *An Sist Sanit Navar* 2003;26(3):29-52.
 53. Sosa Henríquez M, Gómez Díaz J. La osteoporosis. Definición. Importancia. Fisiopatología y Clínica. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2010;2(5):S3-S7.
 54. Cawthon PM, Haslamb J, Fullman R, Peters KW, Black D, Ensrud KE, et al. Methods and reliability of radiographic vertebral fracture detection in older men: The osteoporotic fractures in men study. *Bone* 2014;67:152–155.

55. Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De Laet C, Brown J, et al. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int* 2007;18:1033-46.
56. Sosa Henriquez M, Díez Pérez A. Osteoporosis. Concepto. Etiopatogenia. Clínica. *Rev Clin Esp* 2009;209(1):3-9.
57. González J. Evolución de la masa ósea en diferentes sectores del esqueleto. *Rev Esp Med Nuclear* 1991;10:7-9.
58. Hildebolt CF. Osteoporosis and oral bone loss. *Dentomaxillofac Radiol* 1997 Jan;26(1):3-15.
59. Cao T, Shirota T, Yamazaki M, Ohno K, Michi KI. Bond mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2001 Dec;12(69):604-8.
60. Barnett E, Nordin BEC. The radiological diagnosis of osteoporosis. *Clin Radiol* 1960;11:166-74.
61. Virtama P, Mahonen H. Thickness of the cortical layer as an estimate of mineral content of human finger bones. *Br J Radiol* 1960;33:60-2.
62. Meema HE. Cortical bone atrophy and osteoporosis as a manifestation of aging. *AJR* 1963;89:1287-95.
63. Ibáñez R. Bone mineral density measurement techniques. *AN Sist Sanit Navar* 2003;26(3):19-27.
64. Puig J. Mediciones de masa ósea en antebrazo. *Rev Esp Med Nuclear* 1991;10:10-2.
65. Rico H. Las medidas de masa ósea. *Rev Esp Med Nuclear* 1991;10:91-3.
66. Gómez C, Díaz JB, Virgós MJ, Cannata JB. Importancia de los aspectos metodológicos en la realización de estudios de densitometría ósea. *Rev esp Med Nuclear* 1991;10:23-8.
67. Glüer CC, Steiger P, Selvidge R, Elliesen-Kliefoth K, Hayashi C, Genant HK. Comparative Assessment of Dual-Photon Absorptiometry and Dual-Energy Radiography. *Radiology* 1990;174:223-28.
68. Johnston CC, Slemenda CW, Melton LJ. Clinical use of bone densitometry. *N Engl J Med* 1991;324:1105-9.
69. Giavaresi G, De Terlizzi F, Gnudi S, Cadossi R, Aldini NN, Fini M, et al. Discriminant capacity of quantitative ultrasound versus dual X-ray absorptiometry to determine cancellous bone loss in ovariectomized rats. *Bone* 2000;26(3):297-303.
70. Zárate A, Hernández M, Morán C, Ángeles L. El enfoque moderno de la osteoporosis. *Rev Fac Med UNAM* 2003;46(2):49-51.
71. Fernández García D. Efecto de Raloxifeno sobre los marcadores de osteoclastogénesis en mujeres con osteoporosis postmenopáusica (tesis doctoral). Granada: Universidad de Granada;2007.
72. Caamaño Freire M. Osteoporosis: Documento Consenso del grupo de Osteoporosis de la Sociedad Gallega de Reumatología. *Galicla Clin* 2014;75(1):S5-S23.
73. Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H, Messina OD, Negri A, Sánchez A. Guías para diagnóstico, prevención y tratamiento de la osteoporosis. *Rev Arg Osteología* 2007;6(3):27-42.
74. Lian JB, Stein JS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, et al. Micro RNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:212-7.
75. Sugatani T, Hruska KA. Impaired microRNA pathways diminish osteoclast differentiation and función. *J Biol Chem* 2009;284:4667-78.

76. Vargas Negrín F, Pérez Martín A, López Lanza JR. Osteoporosis. *AMF* 2010;6(5):240-51.
77. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int* 2007;18:1319-28.
78. Niimi R, Kono T, Nishihara A, Hasegawa M, Matsumine A, Kono T, et al. Determinants associated with bone mineral density increase in response to daily teriparatide treatment in patients with osteoporosis. *Bone* 2014;66:26-30.
79. Eriksen EF, Keaveny TM, Gallagher ER, Krege JH. Literature review: The effects of teriparatide therapy at the hip in patients with osteoporosis. *Bone* 2014;67:246-56.
80. Marcus R, Wang O, Satterwhite J, Mitlak B. The Skeletal Response to Teriparatide Is Largely Independent of Age, Initial Bone Mineral Density, and Prevalent Vertebral Fractures in Postmenopausal Women With Osteoporosis. *J of Bone and Min Res* 2003;18(1):18-23.
81. García-Martín A, Avilés-Pérez MA, Quesada Charneco M, Jiménez Moleón JJ, Fonollá Joya J, Muñoz-Torres M. Cambios en marcadores del metabolismo óseo y parámetros ultrasónicos en mujeres postmenopáusicas inducidos por isoflavonas de soja. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2011; 3(4):141-6.
82. Turner AS. Animal Models of Osteoporosis - Necessity and Limitations. *Eu. Cells and Materials* 2001;1:66-81.
83. Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, et al. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone* 2015;70:73-86.
84. Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J* 2012;9(1):111-18.
85. Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res* 2002;37(2):161-5.
86. Moriya Y, Ito K, Murai S. Effectes of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Sci* 1998;40(4):171-5.
87. Gilles JA, Carnes DL, Dallas MR, Holt SC, Bonewald LF. Oral bone loss is increase in ovariectomized rats. *J Endod* 1997;23(7):419-22.
88. Norris SA, Pettifor JM, Gray DA, Buffenstein R. Calcium metabolism and bone mass in female rabbits during skeletal maturation: Effects of Dietary Calcium Intake. *Bone* 2001;29(1):62-9.
89. Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, Aoki K, Ohya K, Ohyama T, et al. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Diseases* 2003;9(1):24-8.
90. Girotra M, Rubin MR, Bilezikian JP. Anabolic Skeletal Therapy for Osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50(4):745-54.
91. Boudignon BM, Bikle DD, Kurimoto P, Elalieh H, Nishida S, Wang Y, et al. Insuline-like growth factor I stimulates recovery of bone lost after a period of skeletal unloading. *J Appl Physiol* 2007;103:125-31.
92. Lynch SE, Buserr D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, et al. Effects of the Platelet-Derived Growth Factor/Insuli-like Growth Factor-I Combination on Bone Regeneration Around Titanium Dental Implants. Results of a Pilot Study in Beagle Dogs. *J Periodontol* 1991;62:710-16.
93. Ortolani E, Guerriero M, Coli A, Di Giannuario A, Minniti G, Polimeni A. Effect of PDGF, IGF-I and PRP on the implant osseointegration. An histological and immunohistochemical study in rabbits. *Annali di Stomatologia* 2014;2:66-8.

94. Martín Monge E, Fernández-Tresguerres I, Blanco L, Khraisat A, Rodríguez-Torres R, Fernández-Tresguerres JA. Validation of an Osteoporotic Animal Model for Dental Implant Analyses: An In Vivo Densitometric Study in Rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26:725–30.
95. Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:351–61.
96. Nakamura K, Kurokawa T, Aoyama I, Hanada K, Tamura M, Kawaguchi H. Stimulation of bone formation by intraosseous injection of basic fibroblast growth factor in ovariectomised rats. *International Orthopaedics* 1998;22:49-54.
97. Dai L, Wu H, Yu S, Zhao H, Xue L, Xu M, et al. Effects of OsteoKing on osteoporotic rabbits. *Molecular Medicine Reports* 2015;12:1066-74.
98. Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez-Salvanes F, Marcos ME, Díaz-Curiel M, et al. Bone mineral measurements of subcondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 2006;35:34–41.
99. Lugero GG, Falco Caparbo V de, Guzzo ML, König B Jr, Jorgetti V. Histomorphometric evaluation of titanium in osteoporotic rabbits. *Implant Dent* 2000;9:303-9.
100. Baofeng L, Zhi Y, Bei C, Guolin M, Qingshui Y, Jian L. Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. *Acta Orthopaedica* 2010;81(3):396–401.
101. Castañeda S, Calvo E, Largo R, González-González R, de la Piedra C, Díaz-Curiel M, et al. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *J Bone Miner Metab* 2008;26:53–9.
102. Amugongo SK, Yao W, Jia J, Dai W, Lay YAE, Jiang L, et al. Effect of sequential treatments with alendronate, parathyroid hormone (1–34) and raloxifene on cortical bone mass and strength in ovariectomized rats. *Bone* 2014;67:257–68.
103. Saville PD.: Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat; a model of osteoporosis. *J Am Geriatr Soc* 1969;17:155-66.
104. Mazziotti G, Maffezzoni F, Doga M, Hofbauer LC, Adler RA, Giustina A. Outcome of glucose homeostasis in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis undergoing treatment with bone active-drug. *Bone* 2014;67:175–80.
105. Wang Z, Goh J, Das de S, Ge Z, Ouyang H, Wee Chong JS, et al. Efficacy of Bone Marrow-Derived Stem Cells in Strengthening Osteoporotic Bone in a Rabbit Model. *Tissue Engineering* 2006;12(7):1753-61.
106. Li X, Li Y, Peng S, Ye B, Lin W, Hu J. Effect of zinc ions on improving implant fixation in osteoporotic bone. *Connect Tissue Res* 2013;54(4-5):290–96.
107. Altman AR, Tseng WJ, Bakker CMJ, Huh BK, Chandra A, Qin L, et al. A closer look at the immediate trabecula response to combined parathyroid hormone and alendronate treatment. *Bone* 2014;61:149–57.
108. Bajaj D, Geissler JR, Allen MR, Burr DB, Fritton JC. The resistance of cortical bone tissue to failure under cyclic loading is reduced with alendronate. *Bone* 2014;64:57–64.
109. Abbaspour A, Takata S, Matsui Y, Katoh S, Takahashi M, Yasui N. Continuous infusion of insulin-like growth factor-I into the epiphysis of the tibia. *International Orthopaedics* 2008; 32:395–402.
110. Schlee M, Pradies G, Mehmke WU, Beneytout A, Stamm M, Gómez Meda R, et al. Prospective, Multicenter Evaluation of Trabecular Metal-Enhanced Titanium Dental Implants Placed in Routine Dental Practices: 1-Year Interim Report From the Development Period (2010 to 2011). *Clinical*

Implant Dentistry and Related Research 2014; 1-13.

111. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Impl Res* 2009;20(4):172-84.

112. Vandamme K, Naert I, Vander Sloten J, Puers R, Duyck J. Effect of implant surface Roughness and loading on peri-implant bone formation. *J Periodontology* 2008;79(1):150-7.

113. Pan J, Zhang F, Qi D. The effects of experimental osteoporosis on bone tissues around hydroxyapatite implants. *Chinese journal of stomatology* 2000;35(5):362-4.

114. Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M. Bone Morphogenetic Protein-2 Coating of Titanium Implants Increases Biomechanical Strength and Accelerates Bone Remodeling in Fracture Treatment: A Biomechanical and Histological Study in Rats. *Bone* 2002;30(6):816-22.

115. Ogawa T, Vandamme K, Zhang X, Naert I, Possemiers T, Chaudhari A, et al. Stimulation of Titanium Implant Osseointegration Through High-Frequency Vibration Loading is Enhanced when Applied at High Acceleration. *Calcif Tissue Int* 2014;95:467-75.

116. Miller PD, Zapalowski C, Kulak CAM, Bilezikian JP. Bone densitometry: The best way to detect osteoporosis and to monitor therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1867-71.

117. Suliman IA, El-Bakri NK, Adem A, Mustafa A, Lindgren JU. The effect of ovariectomy and ovarian steroid treatment on growth hormone and insulin-like growth factor-I levels in the rat femur. *J Orthop Res* 2001;19(6):1008-12.

118. Fritton JC, Emerton KB, Sun H, Kawashima Y, Mejia W, Wu Y, et al. Growth Hormone Protects Against Ovariectomy-Induced Bone Loss in States of Low Circulating Insulin-like Growth Factor (IGF-1). *Journal of Bone and Mineral Research* 2010;25(2):235-46.

119. Yakar S, Courtland HW, Clemmons D. IGF-1 and Bone: New Discoveries From Mouse Models. *Journal of Bone and Mineral Research* 2010;25(12): 2543-52.

120. Guerra-Menéndez L, Sádaba MC, Puche JE, Lavandera JL, Castro LF, Gortázar AR, et al. IGF-I increases markers of osteoblastic activity and reduces bone resorption via osteoprotegerin and RANK-ligand. *J Translational Med* 2013;11:271.

121. Zhao HY, Liu JM, Ning G, Zhao YJ, Chen Y, Sun LH, et al. Relationships between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and OPG, RANKL, bone mineral density in healthy Chinese women. *Osteoporos Int* 2008;19:221-26.

122. Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Salum AW, Toledo S, Nociti H Jr. Platelet-derived growth factor/insulin like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. *Implant Dent* 2000;9(2):126.

123. Nociti FH, Jr, Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Toledo S, Sallum AW. Histometric evaluation of bone regeneration around immediate implants partially in contact with bone: a pilot study in dogs. *Implant Dent* 2000;9(4):321-8.

124. Lamberg A, Schmidmaier G, Soballe K, Elmengaard B. Locally delivered TGF- β 1 and IGF-1 enhance the fixation of titanium implants. *Acta Orthopaedica* 2006;77(5):799-805.

125. Lamberg A, Bechtold JE, Baas J, Soballe K, Elmengaard B. Effect of local TGF- β 1 and IGF-1 release on implant fixation comparison with hydroxyapatite coating. *Acta Orthop* 2009;80(4):499-504.

126. Martín Monge E. Osteoporosis experimental: efectos de la aplicación local de hormona del crecimiento en el tejido periimplantario (tesis doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2008.

127. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. Clin Oral Impl Res 2002;13:623-30.
128. Stenport VF, Olsson B, Morberg P, Tornell J, Johansson CB. Systemically administered human growth hormone improves initial implant stability: an experimental study in the rabbit. Clin Implant Dent Relat Res 2001;3(3):135-41.
129. Luginbuehl V, Zoidis E, Meinel L, rechenberg B, Gander B, Merkle HP. Impact of IGF-I release kinetics on bone healing: A preliminary study in sheep. Eur. J Pharm and Biopharm 2013;85:99-106.

10. ANEXO



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Comité de Experimentación Animal

El Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid, en su reunión celebrada el 27 de abril de 2006, ha considerado cada una de las metodologías que contemplan el procedimiento de experimentación para el desarrollo del

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Título: "Mecanismos moleculares de la prevención del envejecimiento mediante tratamiento hormonal."

Investigador Principal: **JESUS A. FERNANDEZ-TRESGUERRES HERNANDEZ**

A la vista de la documentación presentada, este Comité ha acordado **informar favorablemente** dicho Proyecto de Investigación, ya que cumple los requisitos deontológicos y éticos requeridos para llevarse a cabo.

Y para que así conste, Rafael Camacho Herreros, Jefe del Servicio de Investigación y Secretario del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid emite el presente informe en Madrid a 28 de abril de 2006.


RAFAEL CAMACHO HERREROS

